

Biblioteca Comemorativa  
Orten - IICA - CATIE

03 APR .

RECIBIDO  
Turrialba, Costa Rica

# PROGRAMA AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE P.A.T.S.

## AREA DE CULTIVOS TROPICALES

### BIOTECNOLOGIA

// INFORME ANUAL PARA 1993



CATIE, Turrialba, Costa Rica

# **Biotecnología**

## **Presentación**

La necesidad actual de mejorar la calidad de vida, ha llevado al desarrollo en los últimos años, de una serie de técnicas que permiten un adecuado manejo y aprovechamiento de los recursos.

En el campo de la *agricultura*, la biotecnología provee herramientas como el cultivo de tejidos vegetales, técnicas de ADN recombinante, manejo integrado de plagas, etc; orientadas a la producción y mejoramiento de especies que lleven a un aumento de la producción.

En nuestra *Unidad de Biotecnología*, las técnicas de cultivo de tejidos de especies agrícolas y forestales, han contribuido a la obtención de plantas libres de virus, al mejoramiento genético de café, banano y plátano, a la micropropagación y a la conservación de germoplasma. Así también las técnicas de *Biología Molecular* nos permiten el análisis genético de algunas plantas u organismos fitopatógenos, lo mismo que la detección de virus en plantas de interés comercial.

Además de los programas de investigación que se desarrollan prioritariamente en café, banano, plátano y cacao, se apoyan los de *Educación* a través de cursos de postgrado, capacitación y entrenamiento en servicio. Estos dan la oportunidad a personas de la región tanto de empresas estatales como privadas, de adquirir los conocimientos necesarios para que a su regreso puedan apoyar los programas nacionales en biotecnología y continuar la transferencia de tecnología en sus países.

Se presenta a continuación un resumen de las principales actividades realizadas en la *Unidad de Biotecnología* durante el año 1993.

## AREA DE BIOTECNOLOGIA

### PERSONAL

Ana Abdelnour, Crioconservación.  
François Anthony, Marcadores Genético en Café. (\*\*\*)  
Benoit Bertrand, Mejoramiento Genético. (\*\*)  
Magali Dufour, Biotecnología en Café. (\*\*)  
Jean V. Escalant, Biotecnología. (\*)  
Paul Fritz, (+ +).  
Ramón Lastra, Virología.  
Eduardo Molina, Administración.  
Beat Neuenschwander, Haplotipos Café. (+)  
Juan C. Ramírez, Administración.  
Helga Rodríguez, Biología Molecular.  
Lorena Tortós, Crioconservación.  
Nelly Vásquez, Histología.  
David Walker, Biología Molecular.

#### Personal de Apoyo

William Araya  
Oscar Bogarín  
José Calderón  
Edgar Esquivel  
Rodolfo Galván  
Maritza Loaiza, Secretaria.  
Rigoberto Núñez  
Juan Luis Ortiz  
Alexis Pereira  
Luis Pérez  
Rafael Pérez  
Walter Ramírez  
Kenneth G. Royo.

### COOPERACION CIENTIFICA

- ANACAFE, Guatemala.
- CINVESTAV, México.
- CICY, México.
- CIRAD - FLHOR, Francia. (\*)
- CIRAD - CP, Francia. (\*\*)
- FHIA, Honduras.
- IBP, Cuba.
- ICAFE, Costa Rica.
- IHCAFE, Honduras.
- IICA, Costa Rica.
- INIBAP, Costa Rica.
- La Duquesa, Rep. Dominicana.
- ORSTOM, Francia. (\*\*\*)
- PROCAFE, El Salvador.
- SCRI, Escocia.
- Universidad de Zurich, Suiza. (+)
- Universidad del Estado de Pensilvania, Estados Unidos. (+ +)

### FORMACION

#### Maestría

Carmen Bibierach, Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* sp.

Ramón Hernández, Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* sp. para su evaluación de resistencia a Sigatoka Negra (*Mycosphaella Fijensis*).

María del Rosario Jiménez, Cultivo de anteras en cuatro introducciones de *C. arabica* para obtención de complejos celulares haploides.

José L. Moreno, Partogénesis inducida en *Musa*. Obtención de plantas haploides.

Galileo Rivas, Detección de geminivirus en tomate mediante hibridación de ácidos nucleicos y manejo de semilleros para reducir la incidencia de virosis transmitida por *Bemisia tabaci* (Gennadius) en el campo.

## CAPACITACION

### ENTRENAMIENTOS DE CORTA DURACION

Mario Aguilar, INIFAB (México).  
Técnicas de cultivo de tejidos.

Edna García, CENTA (El Salvador).  
Cultivo de tejidos en especies vegetales tropicales.

Nicolás Guillén, FUSADES (El Salvador).  
Cultivo de tejidos en especies vegetales tropicales.

Antonio Larios, INIFAB (México).  
Técnicas de cultivo de tejidos.

Oswaldo Macz, U. Rafael Landivar (Guatemala).  
Cultivo de tejidos en especies vegetales tropicales.

Walter Quirós, ONS (Costa Rica).  
Cultivo de tejidos en especies tropicales.

Josefina Páez, U. de Venezuela (Venezuela).  
Técnicas de cultivo de tejidos y viveros.

Dinaba Perdomo, U. de Venezuela (Venezuela).  
Técnicas de cultivos de tejidos y viveros.

Fanny Reschoeur, U. de Francia (Francia).  
Técnicas de Embriogénesis Somática.

Guillermo Reyes, UNA (Nicaragua).  
Técnicas de conservación *in vitro*.

Gustavo Vargas, U. de Venezuela (Venezuela).  
Técnicas de cultivo de tejidos y viveros.

Ignacio Vidales, INIFAB (México).  
Técnicas de cultivo de tejidos vegetales tropicales.

Felix Trochez, IHCAFE (Honduras).  
Micropropagación de café.

## CURSOS DE SERVICIO

- Biotecnología aplicada al mejoramiento de café, U.C.R., Sede Regional del Atlántico.

## PARTICIPACION EN CURSOS DE MAESTRIA

- Anatomía Vegetal.
- Curso Teórico práctico de cultivo de tejidos de especies vegetales.
- Fisiología Vegetal.

## CAPACITACION DEL PERSONAL

- Entrenamiento en servicio: Crioconservación de meristemos apicales de *Musa*. ORSTON, Montpellier, Francia. Prof.: F. Engelmann.
- Curso en biotecnología aplicada a las plantas. CIGB, La Habana, Cuba.

## CONSULTORIA

- S. Tanksley (J.V. Escalant.).
- Petiard (F. Anthony).
- T. Bauman (B. Neuenschwander).
- N. Nassar (N. Vásquez).

## PARTICIPACION EN CONGRESOS

- INIBAP Workshop of Biotechnology for Banana and Plantain Improvement. San José, Costa Rica.
- First International Crop Science Congress. Iowa, U.S.A.
- XV Congreso del A.S.I.C. (Association Scientifique Internationale du Café), Montpellier (Francia), 6-11/6/93.
- XVI Simposio sobre caficultura latinoamericana, Managua (Nicaragua), 25-29/10/93.

PUBLICACIONES

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V.M. (1992). Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *Musa balbisiana* (BB). *Cryo-Lett.* 13:159-164.
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; VILLALOBOS, V.M.; ENGELMANN, F. (1992). Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Lett.* 13:297-302.
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; KAMINEK, M.; ARMSTRONG, D. (1992). Inhibition of Dopamine-B-Hydroxylase by Cytokinins. *J. Plant Growth Regul.* 11:221-226.
- AGUILAR, M.E.; VASQUEZ, N.; VILLALOBOS, V.M. 1992. Morphogenetic study of the cocoa (*Theobroma cacao* L.). En revisión.
- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; DUFOUR, M.; ESCALANT, J.V. 1993. Evaluación y caracterización de los recursos genéticos conservados en el germoplasma del CATIE. XVI Simposio sobre caficultura latinoamericana, Managua (Nicaragua). I.I.C.A. / PROMECAFE ed, in press.
- ANTHONY, F.; CLIFFORD, M.N.; NOIROT, M. 1993. Biochemical diversity in the genus *Coffea*: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genetic Resources And Crop Evolution.* 40, 61-70.
- BERTRAND, B.; CATTET, R.; DIAZ, J.; NUÑEZ, C.; MARBAN, N.; ANTHONY, F. 1993. Descripción y estructuración de los cafetos silvestres colectados en Etiopía por el ORSTOM. Consecuencias por el mejoramiento. XVI Simposio sobre caficultura latinoamericana, Managua (Nicaragua), I.I.C.A. / PROMECAFE ed, in press.
- CONTRERAS, C.; DUFOUR, M.; ABDELNOUR, A.; 1992. Cryopreservation of immature zygotic and embryos of cacao. *Eucarpia Symposium.* Angers, Francia.
- CROS, J.; LASHERMES, P.; MARMEY, P.; ANTHONY, F.; HAMON, S.; CHARRIER A. 1993. Approche moléculaire de la diversité génétique et des relations phylogénétiques des caféiers. XV Congreso del A.S.I.C., Montpellier (France), in press.
- DUFOUR, M. 1992. Micropropagation of *Coffea arabica*: *in vitro* production and transfer to field conditions. Conference "Biotechnology for crop improvement in Latin America", 1-7/11. Caracas, Venezuela.
- ENGELMANN, F.; JOUVE, L.; CHABRILLANGE, N.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. 1993. Sensibilité au froid de microboutures *in vitro* de *Coffea arabica* et *C. canephora* pendant leur conservation à différentes températures. Evolution de la concentration en sucre, proline, MDA et éthylène. XV Congreso del A.S.I.C., Montpellier (France), in press.
- ESCALANT, J.V. 1992. La biotecnología en el mejoramiento del banano y plátano. In: "Abstract of II Congresos Bananero". San José, Costa Rica.
- ESCALANT, J.V.; BABEAU, J.; CHATELET, C.; TEISSON, C. 1992. In: "Proceeding of International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for resistance to diseases and pests". Montpellier, Francia.
- ESCALANT, J.V.; BABEAU, J.; TEISSON, C. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in banana and plantain cultivars. In: "BIOCILA". Caracas, Venezuela.

**ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.** 1992. Somatic embryogenesis and cell suspensions in *Musa*. In: "Proceeding of INIBAP Workshop Biotechnology for Banana and Plantain". San José, Costa Rica.

**HAMON, S.; NOIROT, M.; ANTHONY, F.** 1993. "Core Collections": situation et perspectives. In: "Le mil en Afrique. Diversité génétique et agro-physiologique: potentialités et contraintes pour l'amélioration génétique et l'agriculture.", Collection "Colloques & Séminaires", ORSTOM ed., 85-93.

**MARROQUIN, C.; PADUSCHECK, C.; ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.** 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In vitro* cell. Dev. Biol.

**NEUENSCHWANDER, B.; DUFOUR, M.** 1992. Isolated microspore culture of *Coffea arabica* L. Conference "In vitro Culture and Horticultural Breeding", 28/6-2/7. Baltimore, Maryland (U.S.A.)

**NEUENSCHWANDER, B.; BAUMMANN, T.** 1991. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Institute of Plant Biology. University of Zurich. Zurich, Switzerland.

**NOIROT, M.; HAMON, S.; ANTHONY, F.** 1993. L'obtention d'une "Core Collection" de caféiers. Définition des groupes d'échantillonnage et méthodologie. XV Congreso del A.S.I.C., Montpellier (France), in press.

**RAKOTOMALALA, J.J.R.; CROS, E.; ANTHONY, F.; NOIROT, M.; CHARRIER, A.** 1993. Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers. XV Congreso del A.S.I.C., Montpellier (France), in press.

**VASQUEZ, N.; NASSAR, N.** 1992. Unreduced microspores in cassava, *Manihot esculenta* Crantz clones. Sometida a consideración en la Revista Indian Journal of Genetics Breedings Plants.

**VILLALOBOS, V.M.; ABDELNOUR, A.** (1992). Cryopreservation of *Musa* spp. and its potential for long-term storage of other tropical crops. In R.P. Adams and J.E. Adams (eds) Conservation of plant genes. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 197-210.

## AREAS DE INVESTIGACION

<b>Temas de investigación</b>	<b>Campo de Aplicación</b>
<b>Micropropagación por ápices</b> <b>Microestacas</b> <b>Embriones</b>	<b>Café y Pejibaye</b> <b>Banano y Plátano</b> <b>Forestales (Araucaria)</b>
<b>Embriogénesis somática</b> <b>Suspensión de células</b> <b>Regeneración de plantas</b>	<b>Café</b> <b>Banano y plátano</b>
<b>Haplometodos</b> <b>Androgénesis</b> <b>Microesporas</b> <b>Partenogénesis</b>	<b>Musáceas</b> <b>Café</b>
<b>Crioconservación</b> <b>Apices, embriones, callos</b> <b>Células</b>	<b>Musáceas</b> <b>Café</b> <b>Cacao y Pejibaye</b>
<b>Conservación</b> <b>Apices</b>	<b>Banano y Plátano</b> <b>Raíces y Tubérculos</b> <b>Café, Orquídeas y Vainilla</b>
<b>Biología Molecular</b> <b>Mapeo Genético</b> <b>Evaluación de la Distancia</b> <b>Genética</b>	<b>Cacao</b> <b>Café y Musáceas</b>

# UTILIZACION DE MICROESTACAS Y ELABORACION DE UNA METODOLOGIA DE MICROINJERTACION *IN SITU* DE *Coffea arabica*

M. Dufour; B. Bertrand; A. Pereira

## USE OF MICROCUTTINGS AND SETTING UP OF AN *IN SITU* MICROGRAFTING METHODOLOGY ON *C. arabica*

*In vitro* microcutting is a well known technique and has been applied to coffee for more than 20 years nevertheless, its applications to mass propagation raises different practical and economical problems: The *ex vitro* acclimatation is costly and difficult and the feasibility of grafting onto rootstocks resistant to nematodes may be questioned. We describe here two simple techniques which would allow to overcome these two problems at a cheaper price.

### Introducción

La multiplicación vegetativa de *C. arabica* es necesaria para conservar la diversidad genética o para fijar estructuras híbridas obtenidas en el transcurso de un programa de fitomejoramiento. La técnica de microestacas en café es conocida desde años (Custers, 1981). Ella consiste en producir plantitas a partir de yemas axilarias "durmientes" en condiciones asépticas. La utilización de un ambiente controlado y de fitohormonas permite una tasa de multiplicación de 6 nuevas yemas cada ocho semanas. Esta tasa puede ser ampliada por la utilización de un cultivo en medio líquido con inmersión temporaria ("SIT", Berthouly, 1992).

La etapa de aclimatación está controlada (Berthouly, 1991) pero todavía bastante costosa y presenta unos problemas cuando las condiciones ambientales no son perfectas.

También, para conferir a *C. arabica* una cierta tolerancia a los nematodos de suelo (especialmente a *Pratylenchus* el cual constituye una amenaza en Centro América), es necesario injertar microestacas sobre almácigo de *C. canephora*; este punto no es conocido en la literatura.

En este estudio, describimos dos técnicas simples para superar estos problemas a menos costo:

### 1) Aclimatación *ex vitro*:

#### Materiales y Métodos

Microestacas de *C. arabica* cultivadas en un medio de multiplicación fueron separadas de las yemas madres e inducidas a enraizar en condiciones no estériles.

La solución de enraizamiento contenía 75 mg/l AIB y 50 mg/l ANA. Las microestacas quedaron en la solución más o menos 15 horas (un noche) y luego transferidas a bandejas para hielo, una microestaca por hueco, en una mezcla estéril de tierra, arena y pulpa de café (3:1:1) como lo descrito por Berthouly (1991).

Las bandejas, cuales dimensiones fueron 36 cm x 10 cm x 4 cm se colocaron en propagadores con sombra, donde la humedad relativa puede ser progresivamente controlada abriendo la tapa.

#### Resultados

Después de dos semanas, las raíces aparecen a la base de las microestacas. Después de un mes, las plantitas son aclimatizadas y pueden ser transferidas a bolsas de polietileno con la misma mezcla de sustrato donde pueden desarrollarse antes de ser plantadas en el campo.

Un promedio de 100 % de enraizamiento puede ser obtenido cuando las condiciones siguientes son respetadas:

- microestacas de 2 cm de altura mínima con 3 pares de hojas
- propagadores en buenas condiciones de sanidad
- disminución muy progresiva de la humedad relativa
- aplicación de una solución de sales minerales diluida, cada dos semanas.



## Discusión

La metodología aquí descrita utiliza unos puntos ya conocidos (como la composición del sustrato de enraizamiento) y presenta unos aspectos nuevos:

- metodología de fácil ejecución
- reducción de costos
- mejor control de las condiciones ambientales dentro de los propagadores
- ningún daño por depredadores, como es el caso cuando se aclimatan las plantas directamente en el vivero
- distribución y envío fácil de las bandejas a los utilizadores.

## 2) Microinjertación in vitro:

### Antecedentes

Un trabajo reciente (Anzueto, 1993) indica que no existe ninguna fuente de resistencia al nematodo *Pratylenchus* en la especie *Coffea arabica*.

Una metodología actualmente utilizada (en Guatemala y Brazil), para controlar a este nematodo, es de realizar una injertación hipocotiledonaria sobre un porta-injerto de *C. canephora*.

El propósito de este trabajo era verificar si esta técnica puede ser aplicada a microestacas como injertos.

### Materiales y Métodos

Los porta-injertos fueron almácigos procedentes del clon T-3561.

La injertación fue realizada con las plantitas en el estadio "mariposa".

Los injertos fueron microestacas de la variedad Catauá con tamaños variantes de 0.8 a 2.5 cm.

La base de las microestacas fue cortada en oblicuo, una hendidura ligeramente más grande fue hecha sobre el porta-injerto y las dos partes ensambladas con "Parafilm".

Las plantas injertadas fueron luego transplantadas en una mezcla de tierra, previamente desinfectada con

un fungicida y colocadas a la sombra; la capa de "Parafilm" fue quitada después de 20 días.

Las plantas fueron aclimatadas 30 a 40 días después de la injertación.

Dos tipos de injertación fueron probados:

- injertación en hendidura terminal
- injertación en hendidura lateral.

### Resultados y discusión

La injertación es exitosa a 100 % para los dos tratamientos. Sin embargo, se recomienda la injertación con hendidura lateral por que el injerto crece más rápidamente.

### Perspectivas

Couturon (1976) logró un método de injertación de embriones cigóticos en *C. arabica* y *C. canephora*. De la misma manera queremos intentar injertos en estadios jóvenes de embriones somáticos sobre almácigo de café. Eso permitiría una reducción de costos debido a la fase *in vitro*.

### Literatura Citada

ANZUETO, F. 1993. Tesis de Ph.D. Universidad de Rennes, France, 123 p.p.

BERTHOULY, M. 1991. Informe final del Proyecto "Desarrollo y reproducción de variedades con resistencia a la Roya del café: Cultivo de tejidos. Proyecto AID/ROCAP (596-0090), 35 p.p.

COUTURON, E. 1976. *Café Cacao Thé*. XXIII(4): 267-270.

CUSTERS, J.B.M. 1981. 9ª Conferencia Asic, London, 16-20 junio 1980: 589-596.

## OBTENCION DE RAICES *IN VITRO* SOBRE *C. arabica* L.

### Y CULTIVO DE RAICES AISLADAS

M. Dufour, M. Jiménez, R. Galván

#### ***IN VITRO* ROOT OBTENTION ON *C. arabica* L. AND CULTIVATION OF ISOLATED ROOTS**

In this work, we tried to develop a method in order to obtain *in vitro* roots to be further studied for reaction towards nematodes. Two root induction methods were tried: 1) a 15 hrs dip in high auxin concentration followed by root expression in a hormone free medium. 2) a direct root obtention in a solid medium with low level of auxins. The best results were obtained with the second method and with an auxin concentration of ANA 1 mg/l + AiB 1 mg/l (100 % rooted shoots with 5.28 roots per shoot).

#### **Introducción**

Desde un punto de vista económico, el cultivo de café es el más importante de América Central, procurando ingresos de exportación para la mayoría de los países de la zona. De todos los problemas que están afectando esta planta, los nematodos son el número 1 en la zona.

Las dos soluciones actualmente conocidas (el uso de nematocida o la utilización de porta-injertos resistentes de *C. canephora*) no son satisfactorios.

Actualmente, una solución genética es investigada en el marco de un proyecto con la Comunidad Europea\* y la herramienta del cultivo *in vitro* es utilizada como medio para producir raíces con el propósito de ver si es posible inocular nematodos con este tipo de material.

El enraizamiento de los cafetos producidos *in vitro* es usualmente realizado mediante un remojo de 15 horas (una noche) en una solución concentrada en fitohormonas y una aclimatación directa en condiciones hortícolas (Berthouly, 1991).

---

\* Proyecto "Evaluation and selection of germplasm for resistance to prevailing nematodes in Central America".

Hemos intentado, en este estudio, aplicar esta técnica a las condiciones *in vitro* y ver el efecto de diferentes concentraciones hormonales sobre el número y la longitud de las raíces obtenidas.

#### **Materiales y métodos**

La variedad Sarchimor (introducción n° 18135 del CATIE) del *C. arabica* fue utilizada como modelo en este experimento con microestacas ya establecidas en el Banco de Germoplasma. El medio utilizado para la multiplicación era el de Murashige x Skoog suplementado por Bencilaminopurina al 1 mg/l y con un pH de 5.6. Luego se autoclavó el medio 20 min. a 121 °C.

Inducción corta: las microestacas en fase de crecimiento, de 2 cm de altura por lo menos, fueron cortadas y sembradas en un recipiente (vaso Gerber) con su base colocada en un medio líquido (MS<sub>4</sub> + FeEDTA<sub>4</sub> + Auxinas) a pH 5.6 durante 15 horas.

Cinco tratamientos de auxina fueron aplicados:

- T<sub>1</sub> = AIB 25 mg/l
- T<sub>2</sub> = AIB 25 mg/l + ANA 25 mg/l
- T<sub>3</sub> = AIB 50 mg/l
- T<sub>4</sub> = AIB 50 mg/l + ANA 25 mg/l
- T<sub>5</sub> = AIB 50 mg/l + ANA 50 mg/l

Se hicieron 25 replicaciones por tratamiento.

Luego, fueron transferidas a un medio MB sólido MS<sub>2</sub> + Vitaminas de Morel + FeEDTA + Sacarosa 20 g/l + Agar 7 g/l, con pH 5.6, sin hormonas, en viales de vidrio.

El experimento se desarrolló a 25 °C ± 1 a la luz indirecta. El conteo de raíces se hizo a los 15, 30 y 45 días.

Enraizamiento sin inducción: en este caso, las microestacas seccionadas fueron colocadas en un medio sólido con bajo nivel de auxinas donde se quedan hasta que aparecen las raíces.

El medio básico fue el MB en viales con los tratamientos siguientes:

T<sub>6</sub> = ANA 0 + AIB 0  
 T<sub>7</sub> = ANA 0 + AIB 0.2 mg/l  
 T<sub>8</sub> = ANA 0 + AIB 1 mg/l  
 T<sub>9</sub> = ANA 0 + AIB 2 mg/l  
 T<sub>10</sub> = ANA 1 mg/l + AIB 0  
 T<sub>11</sub> = ANA 1 mg/l + AIB 0.2 mg/l  
 T<sub>12</sub> = ANA 1 mg/l + AIB 1 mg/l  
 T<sub>13</sub> = ANA 1 mg/l + AIB 2 mg/l  
 T<sub>14</sub> = ANA 2 mg/l + AIB 0  
 T<sub>15</sub> = ANA 2 mg/l + AIB 0.2 mg/l  
 T<sub>16</sub> = ANA 2 mg/l + AIB 1 mg/l  
 T<sub>17</sub> = ANA 2 mg/l + AIB 2 mg/l  
 Se hicieron 25 replicaciones por tratamiento.

El experimento se desarrollo a 25 °C ± 1 a la luz indirecta. El conteo de raíces se hizo a los 15, 30 y 45 días.

## Resultados

**Cuadro 1.** Resultados de enraizamiento a los 45 días con el método de inducción.

Tratamiento	% microestacas enraizada	Núm. prom. de raíces/microest.
T <sub>1</sub>	32	3.25
T <sub>2</sub>	80	3.05
T <sub>3</sub>	72	2.66
T <sub>4</sub>	52	3.31
T <sub>5</sub>	86	3.38

En el cuadro 1, se puede ver que ningún tratamiento de inducción corta provoca una respuesta total.

El mejor tratamiento es el T<sub>5</sub> (50 mg/l AIB y 50 mg/l ANA), para el porcentaje de microestacas enraizadas así como para el número promedio de raíces.

El segundo experimento (figura 1) enseña que varios tratamientos llevan a un 100 % de enraizamiento (T<sub>9</sub>, T<sub>12</sub>, T<sub>14</sub> o sea AIB 2 mg/l, ANA 1 mg/l + AIB 1 mg/l, ANA 2 mg/l). El número de raíces es más alto para el tratamiento 12 (5.28 raíces).

## Discusión

De manera general, el enraizamiento de las especies leñosas *in vitro* no es fácil y se encuentran unos efectos inhibidores debido a las citocininas usadas en la fase de multiplicación (George y Sherrington, 1984).

Para el café, el enraizamiento *in situ* con inducción corta es exitoso casi en un 100 % (Berthouly, 1991), *in vitro* no es tan fácil.

Los mejores resultados observados con inducción corta fueron 86 % (T<sub>5</sub>) y 80 % (T<sub>2</sub>). En un trabajo de licenciatura (Flores, 1987), unos porcentajes de 93 % fueron obtenidos con 50 mg/l durante 24 horas. Utilizando esta misma concentración logramos solamente 72 % de enraizamiento, pero no es con el mismo genotipo, lo que puede jugar un papel importante.

Con respecto al segundo experimento, el enraizamiento *in vitro* es mucho mejor con una baja dosis de auxina durante 45 días. La mezcla de AIB 1 mg/l + ANA 1 mg/l parece ser la mejor con 100 % microestacas enraizadas y 5.28 de raíces por microestaca enraizada.

Durante los 45 días del experimento, es posible que las auxinas colocadas al principio en el medio desaparecieran totalmente y en forma gradual, lo que provocó una expresión óptima del enraizamiento.

Las raíces producidas en este experimento fueron todas cortadas y cultivadas en cajas Petri en un medio básico. Después de dos meses, aún permanecen vivas, pero no han crecido mucho. En el futuro serán mandadas a los nematólogos para realizar ensayos de inoculación con nematodos.

## Perspectivas

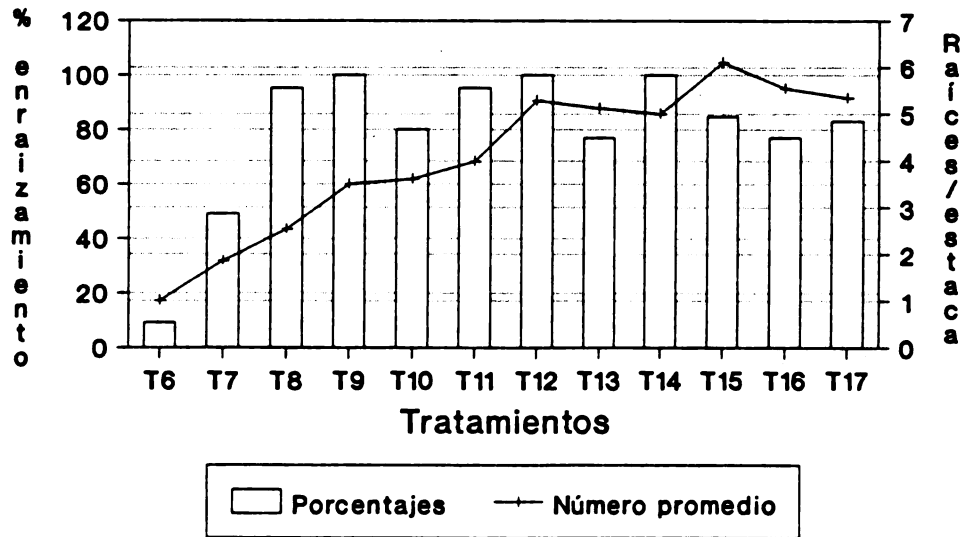
El protocolo que nos ha dado los mejores resultados (T<sub>12</sub>) será aplicado a varios genotipos para ser evaluados con respecto a la resistencia a nematodos.

**Literatura Citada**

**BERTHOULY, M.** 1991. Informe final del Proyecto "Desarrollo y reproducción de variedades con resistencia a la Roya del Café = Cultivo de Tejidos". Proyecto AID/ROCAP (596-0090) 35 pp.

**FLORES GONZALEZ, A.L.** 1987. Tesis licenciatura, U.C.R. 80 pp.

**GEORGE, E.F y SHERRINGTON, P.D.** 1984. Plant propagation by tissue culture. Everseley GB exegenetics. 709 pp.



**Figura 1. Enraizamiento de microestacas *in vitro*, porcentaje y número de raíces después de 45 días.**

**PROPAGACION *IN VITRO* DE PEJIBAYE (*Batris gasipaes*)**

**A. Abdelnour-Esquivel, W. Araya, J.V. Escalant**

***IN VITRO* PROPAGATION OF PEJIBAYE (*Batris gasipaes*).**

The Tissue Culture Laboratory at C.A.T.I.E. initiated the research on *in vitro* propagation of pejibaye. Dessinfection methods, culture media zygotie embryos development were tested. Preliminary results indicate the factibility of the technique for propagation of pejibaye.

El pejibaye es una palmera nativa del trópico americano y ha formado parte de la dieta básica de los nativos de la región desde hace más de 2000 años. Este cultivo es de gran interés para el hombre debido a los múltiples usos que se pueden hacer de sus órganos. La fruta de pejibaye se utiliza como alimento tanto para la dieta de adultos como de infantes debido a su alto contenido de fibra, proteínas, hierro, calcio y vitaminas. El palmito obtenido del seudotallo, se utiliza como alimento siendo considerado producto de exportación de alta calidad. Además, sus hojas y raíces son también aprovechables.

Su explotación comercial se ha visto limitada debido a la falta de materiales homogéneos que produzcan cosechas uniformes y de alta calidad.

El cultivo de tejidos es una técnica que permite la obtención de grandes cantidades de plantas clonales a partir de un número reducido de material superior, en un espacio y tiempo reducido, independientemente de las condiciones ambientales.

Entre 1983 y 1991 se realizaron alrededor de 14 estudios sobre multiplicación de pejibaye por cultivo de tejidos a través de varias vías: calogénesis introducción de brotes laterales, inducción de embriones, etc; sin embargo, los resultados han sido de difícil reproducción.

Por la potencialidad del cultivo para los países de la región y las grandes ventajas del cultivo de tejidos, la Unidad de Biotecnología inició estudios para desarrollar las técnicas de propagación *in vitro* de pejibaye.

Los estudios preliminares se realizaron con embriones cigóticos. Se trató de establecer:

- 1) Métodos de desinfección,
- 2) estadio de maduración de frutos para el aislamiento de embriones,
- 3) medios de cultivo para la germinación de los embriones.

En términos generales se encontró que un tratamiento de desinfección de frutos con cloro comercial fue necesario para la obtención de cultivos de embriones sin contaminar. El aislamiento de embriones de frutos maduros y verdes no mostraron un desarrollo normal en el medio de cultivo. Sería recomendable en la siguiente cosecha trabajar con embriones inmaduros.

La prueba de germinación de embriones en diferentes medios de cultivo mostró que la presencia de hormonas no fue necesaria, se pudo observar cierto efecto negativo induciendo la formación de callos. El medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog con la mitad de los macroelementos, y 30 g/l de sacarosa fue el más adecuado, observándose el mayor porcentaje de embriones germinados.

**EMBRIOGENESIS SOMATICA Y REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE FLORES  
MASCULINAS DE LOS CULTIVARES TRIPLOIDES DE BANANO Y PLATANO**

J.V. Escalant, J.L. Ortiz, L. Pérez

**PLANT REGENERATION THROUGH  
SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM MALE  
FLOWERS OF BANANA AND PLANTAIN  
TRIPLOID CULTIVARS**

Somatic embryogenesis and plant regeneration of banana and plantain cultivars (*Musa* spp.) were obtained by culturing young male flowers. Multiplication and maintenance of embryogenic cultures were achieved by culturing somatic embryos in a temporary immersion system (SIT). A multiplication rate of 40 allowed us to obtain more than 6000 somatic embryos after six months of subculture. Plant recovery frequencies were 60 to 70 %. This method was expanded to different banana and plantain genomic groups.

Los bananos y plátanos son parte de los cultivos más importantes a nivel mundial, con una producción de 70 millones de toneladas. La incidencia de numerosas enfermedades tales como la Sigatoka Negra, el Fusarium, virosis y nematodos, afectando considerablemente la producción y su costo, hace de la obtención de nuevas variedades una prioridad urgente. Desde hace 60 años, diferentes programas de mejoramiento genético se desarrollaron (Rowe, 1984). Sin embargo, debido a la esterilidad y poliploidia de los cultivares triploides, la obtención de nuevas variedades por mejoramiento convencional resultó difícil. Nuevas estrategias contemplan el uso de la biotecnología para complementar los programas de mejoramiento convencional. Dentro de las técnicas de la biotecnología, la transformación genética permite la introducción de genes ajenos para la resistencia a enfermedades. La aplicación de la transformación genética a las plantas cultivadas se incrementa cada día más (Weising *et al.*, 1988). Sin embargo, la mayor limitante en el uso de esta técnica reside en la existencia de un sistema muy eficiente de regeneración de plantas por cultivo de tejidos, tales como la embriogénesis somática, las suspensiones de células y los protoplastos. En este trabajo describimos uno de los métodos más eficiente desarrollado hasta la fecha en el género *Musa*.

Embriogénesis somática

Los cultivos embriogénicos se obtienen a partir de flores masculinas ubicadas en la punta de la inflorescencia. Las flores escogidas se sitúan dentro de los rangos 0 y 15 (0 correspondiendo al meristemo floral). Los estudios se llevaron a cabo sobre varios genotipos de los grupos: *Musa* AAA cv. 'Grande Naine' y 'Yangambi', *Musa* AAB cv. 'Plátano Dominicó' y 'Mysore' y *Musa* ABB cv. 'pelipita'.

A los 2 meses de cultivo sobre un medio adecuado, las flores responden formando un callo amarillo. Después de 3 a 5 meses más de cultivo, sin que se haya hecho ningún subcultivo, un callo translúcido se forma sobre el callo amarillo y se puede apreciar la formación de numerosos embriones somáticos en su superficie (fig. 1). Estos embriones se ven como pequeñas estructuras translúcidas, lisas y presentan una fisura cotiledonaria.

La transferencia de los embriones somáticos al medio de germinación, permite la obtención de plantas completas en un 85 %.

Embriogénesis somática en inmersión temporal

La valorización del método de embriogénesis somática y su utilización para la propagación masiva o la transformación genética, requieren de un sistema de multiplicación que permita la producción de embriones en forma continua. Diferentes sistemas pueden ser utilizados: subcultivos en medio sólido, suspensiones de células o un sistema intermedio de inmersión temporal (Alvard *et al.*, 1993). Con el objetivo de encontrar un método simple y muy eficiente que podría ser usado en un programa de transformación genética, se consideró implementar el sistema de inmersión temporal. El recipiente de cultivo se compone de dos partes unidas entre ellas con un sistema de filtración, que permite al medio líquido desplazarse entre ambas, sin que puedan pasar los embriones cultivados (fig. 2). Con la ayuda de una pequeña bomba, se aplica

una presión en la parte de abajo, lo cual provoca la subida del medio líquido hacia el compartimento de arriba, sumergiendo los embriones somáticos por un período de 1 minuto cada 12 horas. Al liberar la presión, el medio líquido fluye hacia la parte de abajo dejando los embriones en condiciones de humedad saturada. El cultivo se inicia con un cultivo embriogénico de aproximadamente 0,250 g llevando 150 embriones somáticos en un medio de cultivo enriquecido en picloram a  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  (Escalant and Teisson, 1989; Marroquin *et al.*, 1993). Después de 6 meses de subcultivo, la tasa de multiplicación alcanza 40, permitiendo tener un promedio de 6000 embriones (fig. 3). Con un simple cambio de medio, se logra en el mismo sistema de inmersión temporal la germinación de los embriones somáticos y sus desarrollo en plantas enteras en un 70 % (fig. 4).

La originalidad de este método se caracteriza por su aplicación a numerosos genotipos, y por la introducción del sistema de inmersión temporal como una técnica de propagación muy efectiva. Aunque no sean los primeros resultados obtenidos sobre la regeneración *in vitro* dentro del género *Musa*, el método es diferente y muy original en comparación con los demás (Dhed'a *et al.*, 1991; Novak *et al.*, 1989). La eficiencia de este método permite su aplicación en la transformación genética utilizando el bombardeo de partículas (Weising *et al.*, 1988). Además, considerando la alta tasa de multiplicación obtenida en el sistema de inmersión temporal, se recomendaría proceder a investigaciones adicionales para determinar su posible aplicación en la producción masiva. También sería de gran interés considerar este método en un programa de conservación de germoplasma, desarrollando estudios sobre la producción de semillas artificiales (Villalobos *et al.*, 1991).

Además, el sistema de inmersión temporal se podría aplicar a otras especies tales como el café, los cítricos...etc, permitiendo así mejorar considerablemente las técnicas actuales de propagación.

Sin embargo, todas estas aplicaciones requieren de más informaciones en cuanto a la presencia eventual de plantas variantes. Al momento, 700 plantas están en proceso de aclimatación para ser transferidas al campo donde se evaluarán.

## Literatura Citada

ALVARD, D.; COTE, F. AND TEISSON, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation, Effects of temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60.

BAKRY, F.; HORRY, J.P.; TEISSON, C.; TEZENAS DU MONTCEL, H. AND GANRY, J. 1990. Genetic improvement at CIRAD/IRFA. *Fruits. Special Bananas*: 25-39.

DHED'A, D.; DUMORTIER, F.; PANIS, B.; VUYLSTEKE, D. AND DE LANGHE, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46:125-135.

ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant. Cell. Rep.* 7:665-668.

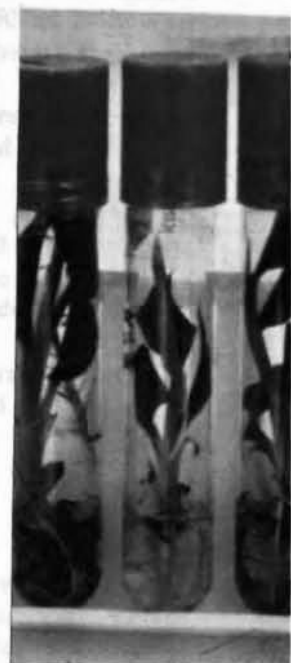
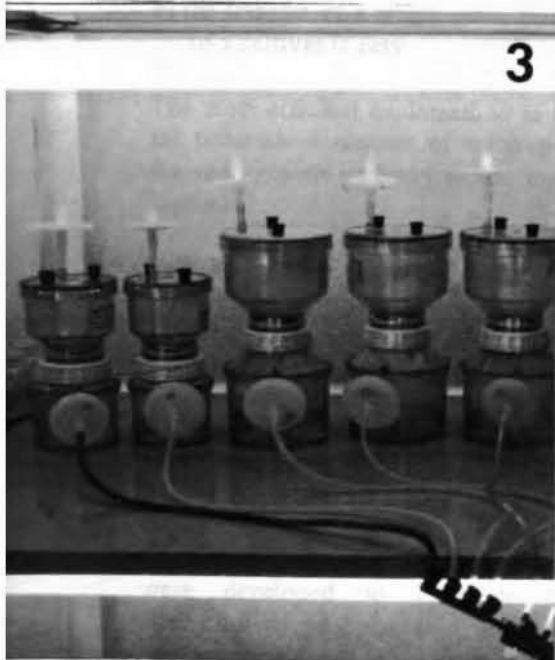
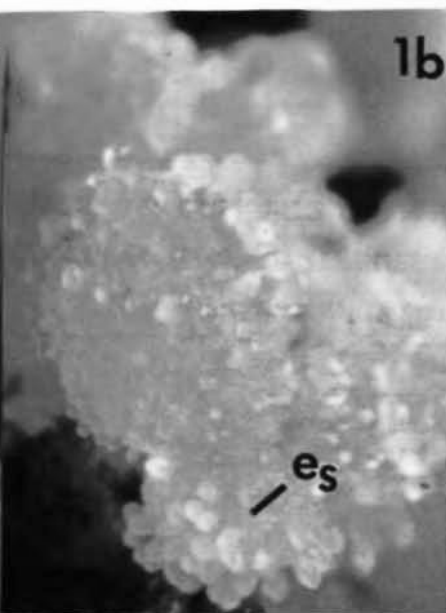
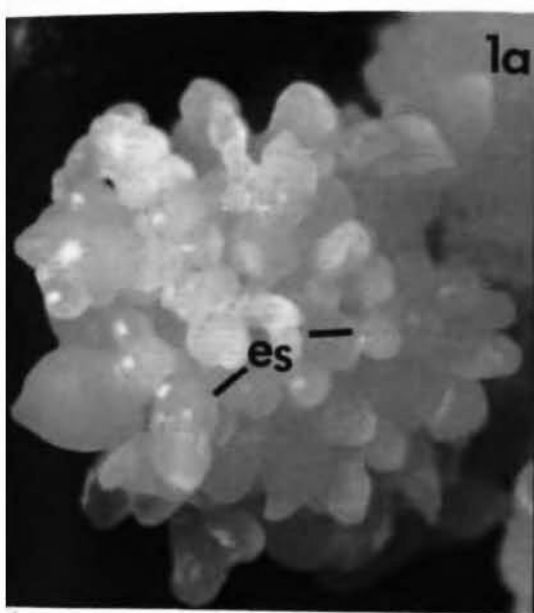
MARROQUIN, C.G.; PADUSCHECK, C.; ESCALANT, J.V. AND TEISSON, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29p:43-46.

NOVAK, F.J.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M.; CONGER, B.V. AND XIAOLANG, T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio. Technol.* 7:147- 158.

ROWE, P. Breeding bananas and plantains. *In*: Janick, J., ed. *Plant breeding review*. Westport, CT: AVI Publishing; 1984:135-155.

VILLALOBOS, V.M.; FERREIRA, P. AND MORA, A. 1991. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. *Biotech. Adv.* 9:197-215.

WEISING, K.; SCHELL, J. AND KAHL, G. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22:421-477.





## INITIATION OF FEEDER CULTURES TO STIMULATE GROWTH OF MULTICELLULAR HAPLOID STRUCTURES OF *C. arabica*

B. Neuenschwander, M. Dufour

### Introduction

Haploid coffee plants can accelerate progress in coffee breeding, for:

- a) the pedigree selection is reduced to a one-step-selection and,
- b) the transfer of a single gene from a wild species to a cultivar is easy.

The most efficient haplomeethod is the induction of the tremendous amount of microspores to undergo the androgenetic pathway and to regenerate them to haploids.

Feeder cultures are broadly used in plant regeneration. In *Brassica napus*, the use of feeder cultures resulted in a drastic increase of embryo yield in low density microspore cultures (Huang *et al.*, 1990). Investigations with mechanically isolated dividing coffee microspores resulting in haploid cell colony formation (Neuenschwander *et al.*, 1993) lead to the conclusion that their further androgenetic development needs the beneficial effect of nursing cells. Therefore two methods (A and B) were developed to establish feeder cultures consisting of proembryonic tissue of *C. arabica*. Method A allows to produce large quantities of proembryonic tissue by dedifferentiation of mature somatic embryos in suspension cultures. With the second method B proembryonic tissue is produced labour extensively on a single medium and without subcultivation.

### Material and methods

The basic composition of media used in A (embryo dedifferentiation medium, EDM) and B (proembryo induction medium, PIM) consisted of a half or full strength Murashige and Skoog medium respectively supplemented with 2 or 3 % sucrose and (mg/l) cysteine HCL (33.3), thiamine HCL (10) and meso-inositol (100). The hormones added to EDM, which corresponds largely to the embryo proliferation medium described in Neuenschwander

and Baumann (1992) were (mg/l) kinetin (0.2) and 2,4-D (0.5) and to PIM (4) and (1).

#### A.

Suspension culture initiation. Between 6 and 8 mature somatic embryos of *C. arabica* cv. Catimor were placed in 20 ml EDM in 50 ml Erlenmeyer flask, agitated at 70 rpm on a gyratory shaker and subcultured every 3 weeks. At the third subcultivation only the freshly produced proembryonic tissue was transferred.

Feeder culture initiation. A portion of the suspension was mixed with 3 ml solidified microspore medium (MM) used to culture isolated coffee microspores (Neuenschwander *et al.*, 1993) and placed in 45 mm Petri dishes. The microspores were spread onto a 0.22  $\mu$ m Durapore membrane (Millipore GVVPO 4700) placed on top of the nurse cultures.

#### B.

Proembryo induction. Young leaves of orthotropic shoots of *C. arabica* cv. Catuai were surface sterilized in a saturated calcium hypochlorite solution and rinsed three x with sterile water. Leaf fragments, 18 mm in diameter, were placed onto 50 ml solidified PIM. The cultures were kept in the dark at 27 °C and not subcultured.

### Results and discussion

#### A.

The dedifferentiation of the mature somatic embryos occurred within 5 to 9 weeks. After the third subcultivation, a fine and homogeneous suspension culture consisting of proembryonic tissue (Fig. 1) was established.

## **B.**

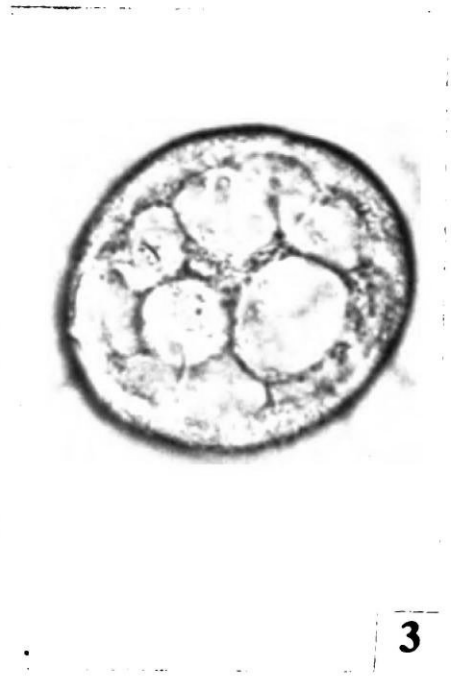
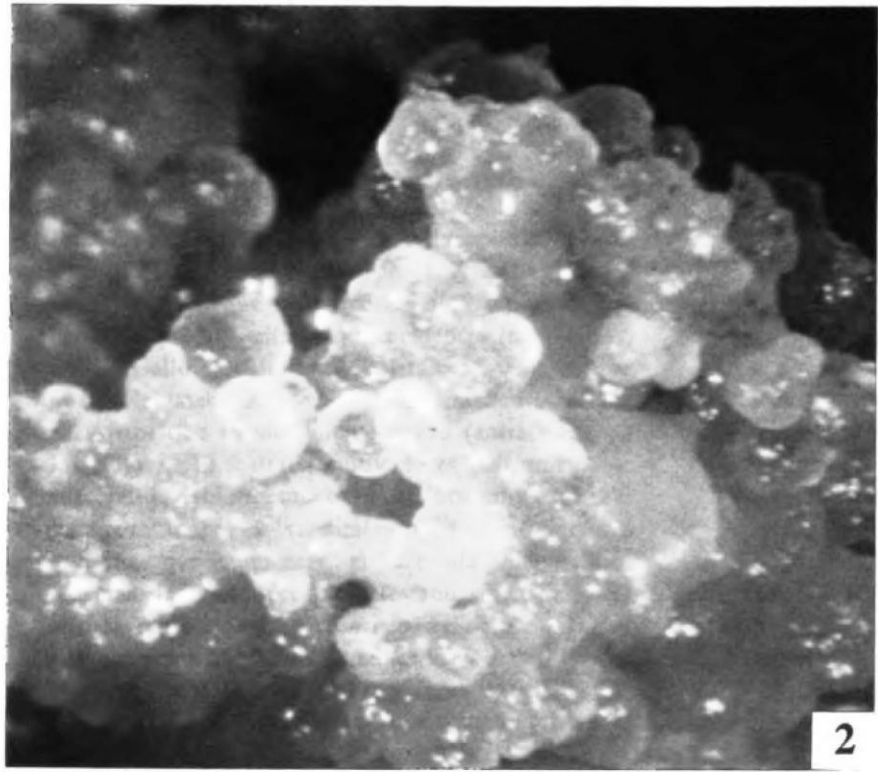
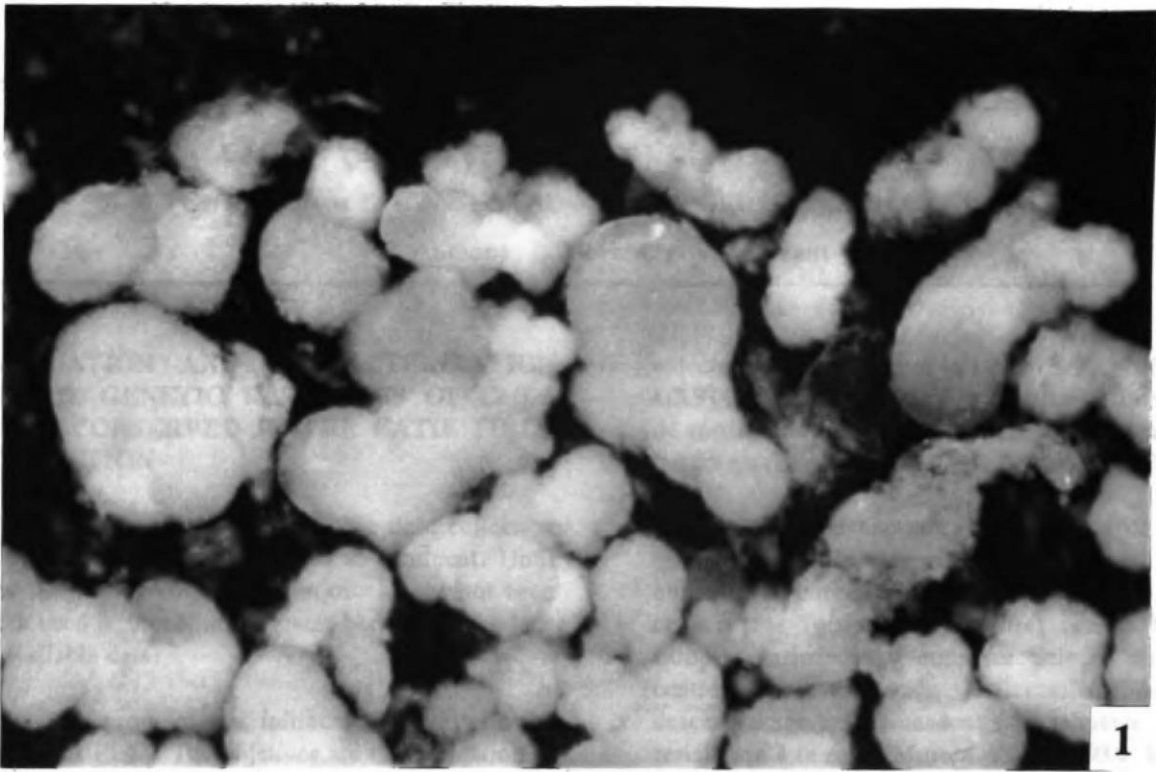
At the peripheric parts of the old and brownish primary callus tissue masses of globular proembryos (Fig. 2) could be harvested after 6 months. They can be used either for somatic embryo proliferation in suspension or directly to establish feeder cultures to stimulate the development of divided coffee microspores (Fig. 3).

## **References**

**HUANG, B.; BIRD, S.; KEMBLE, R.; SIMMONDS, D.; KELLER, W. and MIKI, B.** 1990. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. topas. Plant Cell Reports (Berlin), Vol. 8, p. 594-597.

**NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W.** 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Plant Cell Reports (Berlin). Vol. 10, p. 608-612.

**NEUENSCHWANDER, B.; DUFOUR, M.; BAUMANN, T.W.** 1993. Haploid cell colony formation from mechanically isolated microspores of *Coffea arabica*. 15° Colloque Scientifique International sur le Café. Montpellier, France. ASIC (Paris). p. 760-762.



**Figure 1.** A fine and homogeneous suspension culture consisting of proembryonic tissue of *C. arabica*.  
**Figure 2.** Masses of globular proembryos produced on a single medium.  
**Figure 3.** Multicellular haploid structure of *C. arabica* as a result of microspore division.

**EVALUACION Y CARACTERIZACION DE LOS RECURSOS GENETICOS  
DE *Coffea arabica* L. CONSERVADOS EN EL GERMOPLASMA DEL CATIE**

F. Anthony, J. Morera, J. V. Escalant

**EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF THE GENETIC RESOURCES OF *Coffea arabica* CONSERVED IN THE CATIE FIELD COLLECTION**

CATIE manages the most important field collection of *Coffea arabica* in the American continent. Until now the conserved genetic resources have not been much used in breeding programs because of the lack of available data.

A research program was initiated in 1993 with the support of EEC. The objectives are the evaluation of the genetic variability and the characterization of the accessions. It is based on the revelation of molecular markers (RAPD's) and the observation of morpho-physiological characteristics. The results are used for increasing the genetic basis of cultivated coffee in Central America.

**Introducción**

Desde 10 años, la caficultura latinoamericana está siendo afectada por nuevas plagas y enfermedades muy agresivas que no existían en la región (roya, broca) o que no tenían tanta incidencia (nematodos, Ojo de Gallo, cochinillas de las raíces). Este cultivo es también amenazado por una enfermedad detectada en Africa que es sumamente grave (antracnosis de los frutos). El material cultivado es uniformemente susceptible debido a una base genética muy estrecha. Para mantener el rendimiento, los productores tuvieron que aumentar el uso de plaguicidas. Además, las variedades actuales son adaptadas a un alto nivel de intensificación necesario para expresar sus potencialidades. Se traduce con el cultivo en pleno sol y la utilización de grandes cantidades de fertilizantes. Las consecuencias son graves a mediano plazo: muchos productores podrían desaparecer a causa del aumento en el costo de producción y el medio podría ser fragilizado y contaminado.

Los recursos genéticos podrían resolver algunos de estos problemas. Estudios realizados en Africa y Europa demostraron que algunas procedencias

colectadas en Etiopía por la FAO (FAO, 1968) y el ORSTOM (Charrier, 1978) presentan un buen nivel de resistencia a la roya, nematodos y antracnosis de los frutos (Leguizamón, 1983; Anzueto, 1993).

En el CATIE se encuentra la colección de *Coffea arabica* L. más importante en América, por el número de introducciones y su diversidad. Son conservados genotipos silvestres colectados en Etiopía, variedades y mutantes aislados en varios centros de investigación y fincas, individuos o descendencias seleccionados especialmente por la resistencia a la roya (Morera *et al.*, 1993). Hasta la fecha, este material fue poco utilizado, debido a la carencia de información sobre las características en las plantas conservadas.

Un programa de mejoramiento genético en café se inició en 1993 en el CATIE. Híbridos son creados entre las variedades cultivadas (Catimores, Sarchimores,...) y el material silvestre. El estudio de los recursos genéticos tiene 2 objetivos: la evaluación de la variabilidad genética y la caracterización del material conservado.

**La evaluación de la variabilidad genética**

La evaluación genotípica se estudia con marcadores que no dependen del medio ambiente para revelar diferencias genéticas efectivas. Estudiamos marcadores moleculares llamados RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) revelados por PCR (Polymerase Chain Reaction). Estos marcadores son fáciles de revelar, necesitan poco ADN y pueden ser utilizados rutinariamente. Dichos marcadores se presentan en forma de bandas sobre un gel de agarosa, que corresponden a la copia de fragmentos de ADN.

Este estudio se incluye en un proyecto de la Comunidad Económica Europea que asocia el SCRI (Scottish Crop Research Institute, Escocia), el ORSTOM (Institute Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, Francia) y el CATIE. Los resultados esperados son:

- 1) la revelación de la estructura de la variabilidad genética dentro de la especie *C. arabica*,
- 2) una estimación de la distancia genética que existe entre el material cultivado y el material silvestre, y,
- 3) una estimación de las relaciones filogenéticas entre la especie alotetraploide *C. arabica* y las especies diploides del género *Coffea*.

La revelación de la estructura de la variabilidad genética permitirá seleccionar progenitores en varios grupos genéticos para recombinar las características interesantes. Los nuevos progenitores creados serán utilizados para aumentar la base genética del material cultivado y para introducir nuevas potencialidades.

La evaluación genotípica se completa por una evaluación fenotípica en el germoplasma. Las características observadas se relacionan con los criterios de selección. Son múltiples: la arquitectura, la fertilidad, la resistencia a plagas y enfermedades, las dimensiones de los granos, la fenología y la calidad del café. Este trabajo es necesario para conocer las características que podamos recombinar.

#### La caracterización de los recursos genéticos

La caracterización se fundamenta en los marcadores específicos de las procedencias conservadas, de tipo molecular o morfológico. Permite la revelación de las plantas fuera de tipo y de los duplicados en el caso de las introducciones múltiples. Los resultados esperados son una racionalización del germoplasma y una disminución del costo de mantenimiento.

#### Literatura citada

ANZUETO, F.. 1993. Etude de la resistance du caféier (*Coffea* sp.) à *Meloidogyne* sp. et *Pratylenchus* sp.. Tesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (Francia), 123 p.

CHARRIER, A. 1978. Résultats des études et des expérimentations réalisées au Cameroun, en Côte d'Ivoire et à Madagascar sur l'espèce *Coffea arabica* L. collectée en Ethiopie par une mission ORSTOM en 1966. Bulletin IFCC CIRAD-CP (Francia), N° 14, 100 p.

FAO. 1968. FAO coffee mission to Ethiopia 1964 - 1965. Informe, FAO (Rome), 200 p.

LEGUIZAMON, C.J. 1983. Contribution à la connaissance de la resistance incomplète du caféier Arabica (*Coffea arabica* L.) à la rouille orangée (*Hemilia vastatrix* Berk. & Br.). Tesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (Francia), 183 p.

MORERA, J.; UMAÑA, C.; MORA, E.; HIDALGO, G. 1993. Banco de germoplasma de café del CATIE. Informe, CATIE (Turrialba).

## CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES SOMATICOS ENCAPSULADOS DE CAFE

*Coffea canephora* var. Robusta

L. Tortós, M. Dufour, A. Abdelnour-Esquivel

### CRYOPRESERVATION OF ENCAPSULATED SOMATIC EMBRYOS OF COFFEE *Coffea canephora* var. Robusta.

Encapsulated somatic embryos of *Coffea* were frozen in liquid nitrogen after pretreatments with 0.5 M sucrose during 24 hours and desiccation with sterile air under the laminar flow cabinet. Results showed the highest survival after 2 hours dehydration and rapid freezing (60 %).

#### Introducción

En los últimos años la conservación de células y órganos de las plantas se ha convertido en una herramienta importante para el almacenamiento de germoplasma y material experimental sin alteración genética alguna; como una alternativa a la acelerada pérdida de material genético de especies tropicales tanto domésticas como silvestres, la conservación cumple un papel de vital importancia (1).

La semilla se consideró por muchos años el órgano general para la preservación de germoplasma. Sin embargo, las semillas, por su comportamiento fisiológico durante el almacenamiento se pueden clasificar en dos categorías ortodoxas y recalcitrantes (2). La semilla de café presenta una capacidad germinativa de corta duración bajo condiciones naturales, lo cual dificulta su uso para el intercambio de germoplasma. Su capacidad de germinación, en condiciones de humedad y temperatura ambiental, disminuye rápidamente (3).

Un método de conservación a largo plazo es la criopreservación (Nitrógeno líquido  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de embriones de semillas recalcitrantes ó el almacenamiento en forma de semillas sintéticas, encapsuladas en hidrogel como alginato, en donde el embrión es protegido disminuyendo el peligro del deterioro celular y de las mutaciones (4).

Los estudios realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología del C.A.T.I.E.; empleando embriones somáticos de Robusta encapsulados, deshidratados y

crioconservados en NL ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) permiten desarrollar un método alternativo para la conservación de germoplasma.

#### Materiales y Métodos

Se utilizaron embriones somáticos en estado globular producidas a partir de hojas de *Coffea canephora* var. Robusta. Los embriones se aislaron y se realizó un precultivo hasta 0.5 M de sacarosa por 24 horas. Luego se encapsularon con alginato al 3 % permaneciendo una hora en el medio fortificado con calcio, seguidamente se colocaron en un medio líquido 0.5 M de sacarosa en constante agitación durante cinco días. La deshidratación se realizó en el flujo del aire estéril de una cámara de transferencia y el congelamiento se realizó lentamente hasta  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego fueron congelados en nitrógeno líquido y en forma rápida por inmersión directa.

El descongelamiento en ambos casos, se llevó a cabo en un baño de agua a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los embriones encapsulados se cultivaron en el medio de recuperación fortificado con  $3\text{ mg L}^{-1}$  de BAP para su posterior recuperación.

#### Resultados

Sobrevivencia de embriones somáticos de *Coffea* (Robusta) encapsulados después del congelamiento rápido en nitrógeno líquido.

Desecación (h)	Sobrevivencia después de 12 semanas (%)
0.5	7
1.0	13.8
1.5	11.2
2.0	60

**Sobrevivencia de embriones somáticos de *Coffea*  
(Robusta) encapsulados después del congelamiento  
rápido en nitrógeno líquido.**

Desecación (h)	Sobrevivencia*** después de 12 semanas (%)
0.5	11.25**
1.0	13.85**
1.5	12.15**
2.0	35.20*

\* Variando desde 69 a 10 % en diferentes tests.

\*\* Variando desde 0 a 20 % en diferentes tests.

\*\*\* Promedio de 5 experimentos.

**Literatura Citada**

COUTURON, E. 1980. La maintien de la viabilité des grains de caféiers par leur contrôle de leur teneur en eau et de la température de stockage. *Café, Cacao, Thé* (Francia) 24 (1):27-32.

KOBAYASHI, S. and SAKAI, A. Freeze preservation of nuclear callus of navel orange (*Citrus sinensis*) in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration.

REDENBAUGH, K. 1990. Application of artificial seed to tropical crops. *Hort Science* (U.S.A.) 25 (3):251-252.

ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed science and technology* (Holanda) 1(3):499-514.

## CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES SOMATICOS DE *Musa* AAA GRAN ENANO

A. Abdelnour-Esquivel, W. Araya, J.V. Escalant

### CRYOPRESERVATION OF SOMATIC EMBRYOS OF *Musa* (AAA) GRAND NAINÉ.

Somatic embryos derived from male flowers of *Musa* (AAA) Grand Naine were frozen in liquid nitrogen after pretreatments with various sucrose concentration. Embryos frozen to  $-40^{\circ}\text{C}$  showed 75 % survival and 50 % direct germination and embryos frozen in liquid nitrogen showed 40 % direct germination. Embryos which survived as callus developed embryos rapidly in the recovery medium.

La colección mundial de *Musa* se conserva *in vitro* bajo la modalidad de crecimiento reducido y a pesar de que se utiliza de manera rutinaria, la investigación en esta área ha sido enfocada a buscar una técnica que asegure la estabilidad genética del material conservado y disminuya los riesgos de pérdida por manipuleo.

La criopreservación o almacenamiento en nitrógeno ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) es la técnica que cumple con los requisitos antes mencionados y ya ha sido probada con éxito en un gran número de especies tanto subtropicales como tropicales. Algunas de las mayores ventajas de la criopreservación es que permite el almacenamiento de materiales generados en el laboratorio como suspensiones celulares, callos, embriones somáticos, etc, lo cual sería difícil o imposible con otros métodos de conservación.

La presente investigación tuvo como objetivo experimentar en la criopreservación de embriones somáticos de *Musa*.

El material experimental consistió de embriones somáticos y pequeños agregados de 3 ó 4 embriones inducidos a partir de flores masculinas del triploide Gran Enano utilizando el método desarrollado por Escalant y colaboradores (1994).

Los embriones se cultivaron en un medio de pretratamiento con concentraciones crecientes de sacarosa (0.3 M a 1 M) por 1 a 3 días. Una hora antes de congelamiento se incubaron a  $5^{\circ}\text{C}$  en el medio líquido con 5 % DMSO. El congelamiento fue lento (utilizando un congelador programable Cryo-Med) a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  y luego las muestras se introdujeron al nitrógeno líquido.

El descongelamiento fue rápido en un baño de agua a  $40^{\circ}\text{C}$ . Luego, los embriones fueron plantados en el medio de recuperación (MS + 0.1 M sacarosa, 0.5 g/l BAP y 2 mg/l IAA).

Después de 5 semanas se evaluó la sobrevivencia. Los embriones que recibieron el pretratamiento y la crioprotección (controles) sobrevivieron en un 100 %. Un porcentaje de éstos formó inicialmente callo pero un 60 % germinó directamente. Los que fueron congelados hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  mostraron 75 % de sobrevivencia y 50 % de germinación directa. Aquellos embriones congelados en nitrógeno líquido mostraron un 40 % de germinación directa. Cabe mencionar que el material que sobrevivió produciendo callo, rápidamente produjo embriones y éstos también se desarrollaron en plántulas.

Estos resultados, al igual que los obtenidos con embriones cigóticos (1) y suspensiones celulares de *Musa* (2) demuestran claramente que la criopreservación es una técnica viable para la conservación de *Musa* a largo plazo, más aún, para el almacenamiento de materiales generados en el laboratorio de los cuales bajo condiciones normales de cultivo son especialmente susceptibles a variación genética y a perder rápidamente su potencial de regeneración.

### Literatura Citada

ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *M. balbisiana* (BB). *Cryo-Letters* 13:159-164.

ESCALANT, J.V.; TEISSON, C.; COTE, F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.* (July, 1994).

PANIS, B.J.; WITHERS, L.A.; DeLANGHE. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-Letters* 11:337-350.



## METODOLOGIA PARA EL AISLAMIENTO DE ADN EN CAFE

R. Núñez, M. Dufour, F. Anthony

### METHOD OF COFFEE DNA ISOLATION

A method of coffee DNA isolation was developed in the laboratory. It requires fresh young leaves (flushes) or freeze-dried samples. The advantages are the low cost, the absence of risks of contamination for the staff (because it does not use ethidium bromide) and the short periods of centrifugation.

The method was used for studying the genetic variability in *Coffea arabica* accessions conserved in the field collection of CATIE. It also permits the DNA isolation of *C. canephora* and *C. liberica* samples.

El aislamiento del ADN celular representa una etapa preliminar, muy importante, para todos los estudios en Biología Molecular. Las técnicas de extracción del ADN se diferencian por el tipo de material utilizado, el grado de pureza y el rendimiento. Se fundamentan en la susceptibilidad diferencial de los ácidos nucleicos a los efectos desnaturalizadores de los disolventes orgánicos, como el fenol y el cloroformo.

La metodología utilizada en la Unidad de Biotecnología del CATIE se inició con el apoyo financiero de la Comunidad Económica Europea. El proyecto CEE tiene como objetivo el desarrollo de los marcadores moleculares para los recursos genéticos de café en América Central.

#### Materiales y métodos

Se utilizan 5 g de hojas jóvenes tiernas del primer par (estadio "fluch"). El material fresco o liofilizado se tritura con nitrógeno líquido en un mortero hasta pulverizarlo.

La muestra se transfiere a un tubo para centrifugar, en el cual se han agregado 12,5 ml de la solución extractora (100 mM Tris HCl pH 6, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0,07 %  $\beta$  mercapto-etanol, 100 mM DDTc, 100 mM ácido cítrico sal trisódica, 1,4 % PVP 10000) y 1 ml de una solución CTAB al 20 %. La muestra se mezcla bien y se incuba por 10 mn a

65 °C. Se agregan 25 ml de cloroformo isoamilico al 24:1 y se centrifuga a 2500 rpm por 30ámn.

El sobrenadante se traspasa cuidadosamente a un nuevo tubo para centrifugar al cual se agregan 2,5 ml de acetato de potasio 5 M. El extracto se mezcla suavemente y se incuba 30 mn en hielo. Se centrifuga a 2500 rpm por 30 mn. El extracto se separa sobre un filtro de Miracloth. En el tubo de filtración se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C. Se mezcla cuidadosamente y se precipita por al menos 30 mn a -20 °C.

Con la punta doblada en forma de anzuelo de una pipeta Pasteur, se toman los precipitados de ADN y se transfieren a un nuevo tubo para centrifugar al cual se agregan 5 ml de la solución T.E. (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA). Se disuelve sin agitar. Se centrifuga a 2500 rpm por 15 mn. La parte disuelta se verte en un tubo al cual se agregan 540  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M. Se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto o isopropanol previamente enfriado a -20 °C durante la noche.

El precipitado se transfiere en un tubo de microcentrifugadora y se disuelve nuevamente en T.E.. Se agregan 54  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, se precipita en etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C y se centrifuga a 15000 rpm. El precipitado se lava en etanol al 70 % por 20 mn. Se coloca luego en nuevo tubo de microcentrifuga y se centrifuga por 5 segundos. El tubo se coloca en posición invertida sobre un papel toalla hasta secar el precipitado pero no totalmente.

El precipitado se disuelve en T.E.. Se agregan 1  $\mu$ l de RNAsa, proteinasa K (50  $\mu$ l/ml) y se incuba a 37 °C por 15 mn. Se agregan 2 volúmenes de fenol cloroformo, se agita en vortex y se centrifuga por 5 mn en la microcentrifuga. El sobrenadante se traspasa cuidadosamente a un nuevo tubo. Se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C y se redissuelve en T.E..

El ADN extraído se conserva a -20 °C.

**Resultados**

Las hojas de café tienen gran concentración de polifenoles. Este tipo de sustancias ocasionan dificultades para aislar el ADN, y requieren el desarrollo de metodologías específicas para minimizar este problema (Couch y Fritz, 1990). Sin embargo, presentan procesos poco económicos y riesgosos debido a la utilización de gradientes de cloruro de cesio, con concentraciones altas de bromuro de etidio. Este último reactivo es bien conocido por su alto poder mutagénico. En este contexto, la metodología desarrollada en la Unidad de Biotecnología del CATIE presenta varias ventajas:

- 1) reduce el costo económico, pues no utiliza el gradiente de cloruro de cesio,
- 2) reduce el riesgo de contaminación del personal y del medio, pues no utiliza el bromuro de etidio, y,
- 3) se agiliza la extracción, pues no necesita largos períodos de centrifugación.

Esta metodología se utiliza para el estudio de los recursos genéticos de *Coffea arabica* conservados en el germoplasma del CATIE. Con una buena organización, 6 genotipos se tratan al mismo tiempo. Así, 24 muestras de ADN pueden ser obtenidas por semana. El ADN extraído tiene una buena calidad. Algunas muestras son conservadas desde un año sin presentar signos de degradación.

Puede utilizarse para extraer el ADN de otras especies de café, como *C. canephora* y *C. liberica*. Funciona también con material liofilizado lo que permite estudiar procedencias conservadas en otras colecciones vivas. Una limitante es la edad de las hojas: solamente hojas jóvenes pueden ser utilizadas.

**Literatura citada**

COUCH, J.A. & FRITZ, P.J.. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 8(1), 8-12.

## ANALISIS GENETICO DEL RETROCRUCE CATONGO x ARBOL 33

(CATONGO x POUND 12)

P. Fritz, J. Osei, J. Morera, H. Rodríguez, D. Walker, J. Lainez, A. Alfaro, R. Lastra

### GENETIC ANALYSIS OF THE CATONGO x (CATONGO x POUND 12) BACKCROSS.

A linkage map of the *Theobroma cacao* genome is being constructed using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers to study chromosome segregation in a Catongo x (Catongo x Pound 12) backcross population. Markers which cosegregate with genes involved in traits of interest can be used to expedite the development of superior genotypes. Morphological characteristics of individual trees, levels of disease resistance, and seed quality are being monitored in order to identify markers linked to desirable genes. Molecular markers permit the investigation of QTL (Quantitative Traits Loci), such as those responsible for flavor, in a straightforward manner, and are especially useful in the improvement of tree crops because they allow selection at the seedling stage.

Para construir un mapa de ligamiento genético es necesario contar con una población definida de cacao. Esta población fue iniciada en CATIE en 1978 al cruzar el clon Pound 12 con el clon Catongo. De este cruce 120 árboles híbridos fueron plantados bajo diferentes tipos de sombras y han sido la fuente de extensos trabajos de agroforestería en CATIE.

En 1990 el polen de uno de estos árboles se usó para polinizar el Catongo realizando así un retrocruce y producir una población segregante que está siendo usada para la construcción de un mapa de ligamiento. Actualmente 168 árboles de esta población crecen en el campo en la finca experimental Cabiria en CATIE.

El mapa que se obtenga tiene valor principalmente como estructura en la selección de características importantes para el mejoramiento genético. Cuando el mapa esté saturado de marcadores, será posible relacionar estos marcadores moleculares con características agronómicas deseables en el estado plántula, sin necesidad de esperar a que las plantas lleguen al estado adulto, ya que se examinará directamente el ADN que es el material genético de

todos los seres vivos. Características tales como resistencia a insectos y enfermedades, calidad de las semillas (aroma y sabor a chocolate) también se están evaluando como descriptores en esta población.

El presente trabajo pretende informar y documentar sobre algunos datos obtenidos de las evaluaciones agronómicas desde mayo de 1991 fecha en que se plantaron los árboles en el campo hasta agosto de 1993. Es importante anotar que se tienen otras 4 poblaciones bajo el sistema de retrocruce desarrolladas en CATIE usando algunos de los árboles híbridos del experimento central de la Montaña y se espera recolectar de ellos el mismo tipo de datos.

Dentro de las características agronómicas más importante se tiene: tiempo inicial de floración, color de las flores, semillas y hojas nuevas, autocompatibilidad, tasa de crecimiento, rendimientos, índice de semilla, índice de mazorca, número de óvulos por flor, etc. También se espera medir varias características.

Muchas de estas características son cuantitativas determinadas por más de un gen, pero que puede ser posible determinar su posición en el mapa usando estas nuevas tecnologías de los marcadores moleculares. Otros descriptores que están siendo medidos en el mapa incluyen: cantidad de manteca de cacao por semilla, composición de los triglicéridos en las semillas, sabor de chocolate en las semillas, resistencia a varios hongos y resistencia de algunos insectos.

#### 1. Precocidad:

Varios de los árboles de la población parecen ser excepcionalmente fértiles por su habilidad para florecer y producir mazorcas maduras.

## 2. Tasa de crecimiento:

Tal como se esperaba la variación en esta característica fue notable. Se encuentran árboles con alturas promedio de 2 m y otras con alturas de 50 cm. Sin embargo, se ha tratado esta característica con precaución debido a diferencias en la composición de nutrientes en el suelo, sombra y otros factores ambientales que están interactuando con el genotipo.

## 3. autocompatibilidad:

Se están haciendo los estudios de compatibilidad pero no se tienen los datos de toda la población ya que no todos los árboles han florecido.

## 4. Color de las hojas, semillas y flores:

Se encontró una segregación de 1:1 en esta característica para el color de las flores, hojas y semillas. Por lo tanto, se concluyó que esta característica se comportaba como un gen de herencia mendeliana. Posiblemente un gen que codifica para una enzima en la vía biosintética de las antocianinas es el gen responsable de la presencia de color en los árboles con coloración púrpura. (Fig. 1)

En la actualidad se están realizando otros estudios para análisis de sabor y aroma de chocolate pero aún no se tienen resultados.



**Figura 1. Segregación en el color de las hojas.**

Se observan 2 plantas de la población segregante del retrocruce contra Catongo. La segregación en el color de las hojas jóvenes es también un marcador morfológico útil para la construcción del mapa de ligamiento en *Theobroma cacao*. **A.** Planta segregante hacia Catongo para el color de las hojas jóvenes. **B.** Planta segregante hacia Pound 12 para el color de las hojas jóvenes.

**USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA CONSTRUCCION DE UN MAPA DE  
LIGAMIENTO GENETICO EN CACAO, *Theobroma cacao* L.  
H. Rodríguez; D. Walker; R. Lastra; P. Fritz**

**USE OF MOLECULAR MARKERS FOR THE CONSTRUCTION OF A GENETIC LINKAGE MAP IN CACAO, *Theobroma cacao* L.**

A Catongo x (Catongo x Pound 12) backcross population established at CATIE is being used to construct a genetic linkage map of cacao. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers found to be segregating in the population are identified and their pattern of segregation is then compared with that of other markers and a variety of phenotypic characteristics which are being monitored. Cosegregation indicates linkage, and the identification of linkage groups will make it possible to evaluate trees for the presence or absence of certain desirable genes. Since this permits screening at the DNA level, it is independent of tree maturity and environmental effects, and would thus be very useful in expediting the development of superior genotypes of cacao, an effort which has thus far been limited by long generation times and the expense of phenotypic evaluation.

En el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE se encuentra una colección de cacao con 1148 cultivares de germoplasma y una familia de cacaos compuesta por los padres Catongo y Pound 12, una población híbrida F1 de 15 años y una población segregante de 2 años obtenida por el retrocruce del árbol híbrido # 33 contra el Catongo.

En especies perennes como el cacao, es bien conocido el hecho de los lentos progresos en el mejoramiento, debido a los largos períodos de generación (3-5 años en cacao); pero más importante, es la falta de un mapa de ligamiento genético que permita a los mejoradores la toma de decisiones dirigida que permita un avance rápido.

El CATIE tiene gran tradición en el mejoramiento genético del cacao en la forma tradicional. La creación del laboratorio de Biología Molecular y la presencia del material genético permitieron que se este desarrollando un mapa de ligamiento genético, basándose en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (1), con la cual es posible

amplificar fragmentos específicos de ácido desoxirribonucleico (ADN).

El ADN es el material genético de todos los organismos vivos y de muchos virus. La técnica mencionada, permite estudiar directamente el ADN apoyándose en el concepto teórico de los marcadores moleculares. Un marcador molecular o genético es una característica presente en un individuo que indica la constitución de un gen en particular (3). Cuando se tiene un gran número de marcadores a intervalos relativamente cortos en el genoma de una familia, es posible construir un mapa de ligamiento genético.

Los mapas de ligamiento están siendo usados por los mejoradores para la selección de plantas en etapas tempranas de desarrollo, específicamente dirigida hacia resistencia a enfermedades, rendimientos, precocidad, calidad, etc. Además la existencia de información disponible sobre la herencia de características importantes, sobre su localización precisa de los genes en los cromosomas y su distribución dentro de los bancos de germoplasma contribuirá en el manejo de las colecciones mundiales.

La técnica PCR, permite examinar los marcadores moleculares llamados RAPD o ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplified Polimorphic DNA) por sus siglas en inglés, que facilitan el estudio de la segregación de regiones homólogas del genoma, en individuos de una población segregante como la F2 o un retrocruce. Estos marcadores RAPD, están siendo utilizados en CATIE para estudiar la familia de cacaos y así comprender los procesos de la herencia de características agronómicas y aquellas relacionadas con la calidad en la fabricación de chocolates. Los únicos requisitos para desarrollar mapas basados en este tipo de marcador son (1) reproducción sexual (2) un conjunto de-"primers" polimórficos.

Brevemente, los pasos a seguir en la construcción de un mapa son: (1) Identificación de "primers" que revelen presencia-ausencia de una banda polimórfica

entre los padres seleccionados (Aa x aa) (2) Evaluar los polimorfismos en un cruce de prueba, por ejemplo en los heterocigotos Aa y (3) realizar un análisis de segregación en la progenie F2 o retrocruce.

Junto con este análisis del ADN se debe realizar un estudio de las características fenotípicas en el campo, para poder correlacionar los marcadores moleculares con las características que se están deseando mejorar (1). En la actualidad, se tiene un registro de las 165 plantas que componen la familia que se está estudiando, con datos como altura, diámetro del tallo, compatibilidad, color de los rebrotes, floración, etc, que permitirán a lo largo de su ciclo productivo, introducir nueva información que podrá ser utilizada como herramienta en mejoramiento.

Los resultados más relevantes muestran que aproximadamente 40 de los 163 "primers" son polimórficos. Al probarlos, en la población segregante, se observaron bandas presentes y ausentes indicando que este marcador se comporta como un marcador dominante. Cuando los datos fueron sometidos al análisis estadístico (algoritmo de multipuntos para un análisis de ligamiento de grupos) con el programa MAPMAKER, se encontraron 30 grupos de ligamiento. De los cuales el grupo de ligamiento # 7 contiene marcadores asociados con el color de las hojas. De esta manera, se comprueba la utilidad del uso de los marcadores. Por ejemplo, la presencia del marcador ligado al color, permite inferir sobre la presencia del gen que codifica para el color en este caso el gen de la antocianina.

Cuando se tengan suficientes marcadores y estos puedan ser correlacionados con características morfológicas, fisiológicas, etc, los resultados podrán ser utilizados inmediatamente en la selección de plantas en el campo. Características de carácter cuantitativo tan importantes como las que proporcionan el sabor y el aroma al chocolate podrán ser mapeadas, y se puede esperar que por técnicas de ingeniería genética se puedan transformar plantas con los genes que lleven estas características.

Hasta el momento, se han examinado 50 plantas con 123 "primers", la meta es analizar dicha población con unos 500 "primers". La figura 1a. muestra un mapa preliminar de baja densidad de dos cromosomas, que ha sido obtenido con los datos que

se han desarrollado hasta la fecha. Como se puede observar en la figura 1b., la segregación de bandas en la progenie permite basado en el número de recombinantes establecer la segregación de fragmentos de ADN. Una vez recolectados un mayor número de datos y junto a los mapas que están siendo desarrollados por otros laboratorios con esta misma población, se podrán alinear los mapas obtenidos con los diferentes marcadores y de esta manera se obtendrá al final un mapa de muy alta densidad que estará a la disposición de los fitomejoradores.

El objetivo final será brindar a los agricultores materiales de altos rendimientos y tolerantes a las principales enfermedades que atacan este cultivo, pero además se podrá contar con descriptoras de suma importancia como cantidad de manteca de cacao por semilla, composición de los triglicéridos en las semillas y sabor y aroma de chocolate, que son de interés para la industria de chocolates en el mundo (1).

En el futuro se piensa iniciar la evaluación tanto morfológica como por medio de marcadores moleculares de otras familias de las cuales ya se han realizado los cruces correspondientes, con el fin de poder identificar y cubrir la mayor parte del genoma del cacao. También, con la experiencia adquirida en CATIE, se podrán iniciar estudios similares en otras especies de interés para la región.

#### Literatura Citada

FRITZ, P. J.; OSEI, J.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; LAINEZ, J.; LASTRA, R. 1993. A backcross population for genetic analysis of, *Theobroma cacao*, L. (In preparation).

MULLINS, K. B.; FALOONA, F.A. 1987. Specific synthesis for DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* (EE.UU.) (155):335-350.

SMITH, J. S. C. 1989. Gene markers and their uses in the conservation, evaluation and utilization of genetic resources of maize (*Zea mays* L.). IBPGR Training courses. Lecture Serie 2. p. 125-135.

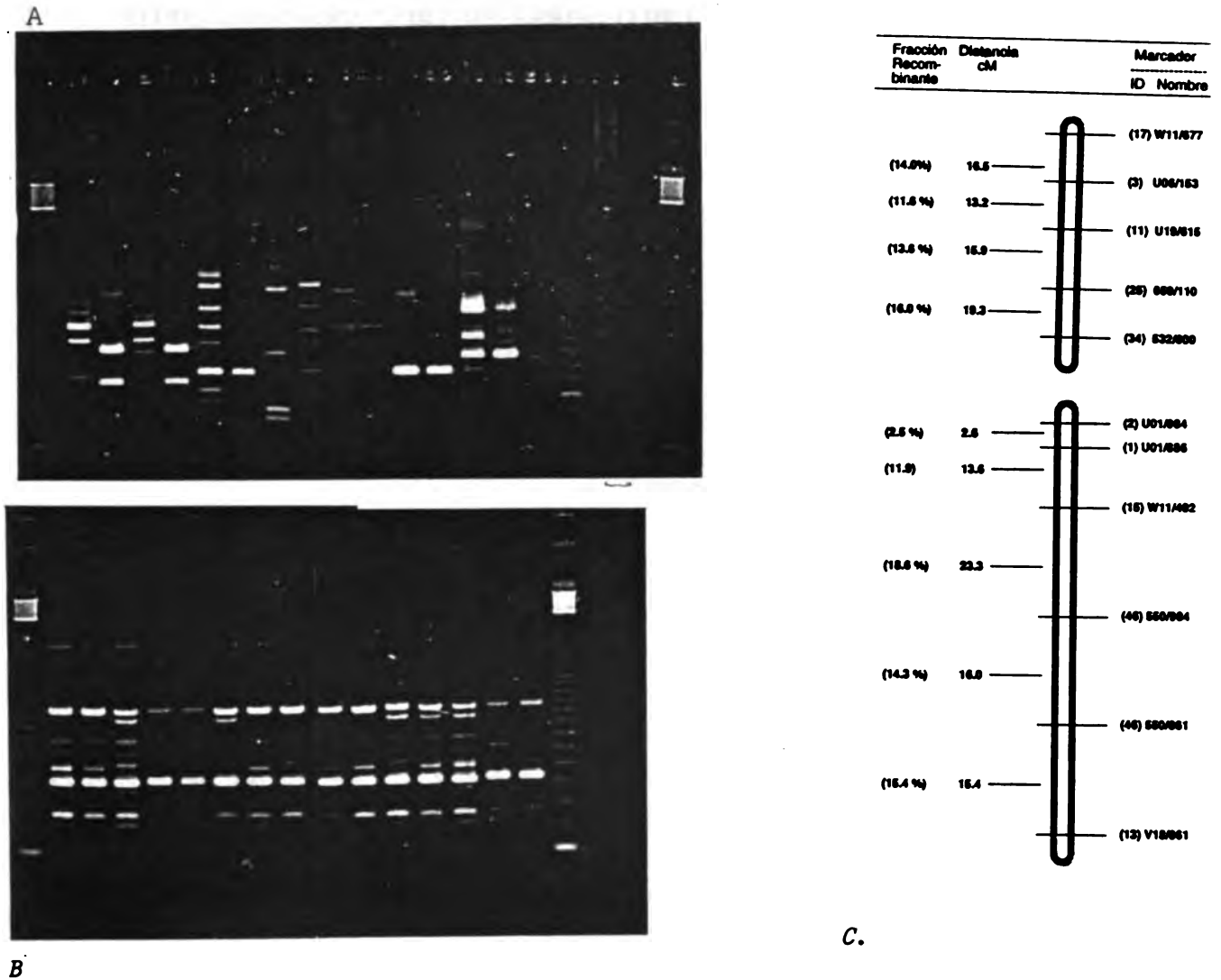


Figura 1. Construcción de un mapa de baja densidad en *Theobroma cacao* basado en una población segregante en un sistema de retrocruce. Finca Experimental Cabiria CATIE - Turrialba, Costa Rica. **A.** Selección de los primers polimórficos en los padres (Juego OPERON). **B.** Segregación de marcadores en la población segregante. En los extremos el marcador molecular escalera de 123 pares de bases. **C.** Mapa de ligamiento generado por el programa MAPMAKER.



## ESTUDIO HISTOLOGICO DEL DESARROLLO DE LA ANTERA EN SEIS VARIEDADES SILVESTRES DE CAFE ETIOPE

M. Jiménez, N. Vásquez, M. Dufour

### HISTOLOGICAL RESEARCH ON THE ANTHER'S DEVELOPMENT OF SIX ETHIOPIAN COFFEE VARIETIES

The parents selection studies and evaluation of germplasm from the Ethiopian region, revealed male infertility problems, under field conditions. For that reason, histological studies were conducted in six cultivars, in order to validate the field information.

All cultivars studied, except the 4905, showed normal appearance pollen grains mixed with some non viable ones. The 4905 cultivar only showed non viable pollen grains. The anther's development occurred normally in all cultivars studied.

#### Introducción

La especie de café más cultivada en el mundo es el *Coffea arabica* L. ya que es la que produce mejor calidad. Su cultivo ha estado asociado al mundo árabe quizás por 700 años.

En la actualidad la mayoría de los autores están de acuerdo en que Etiopía es el centro de origen de esa especie, debido a que la variabilidad observada en esta región es mucho más grande que la que presentan los millones de cafetos cultivados en el trópico.

Muchos de estos cultivares de la región Etiope están siendo estudiados en el CATIE, con el fin de revelar la variabilidad genética de la especie *Coffea arabica* L., crear y seleccionar progenitores para el programa de mejoramiento genético y caracterizar las procedencias conservadas en el germoplasma del CATIE (Anthony *et al.*, 1993).

Dentro de las técnicas de mejoramiento aplicadas, la polinización manual constituye una herramienta muy valiosa. Sin embargo, se ha encontrado algunos cultivares que en el campo han mostrado ausencia de polen. Debido a que se desconocen las razones para este comportamiento, se realizó el presente trabajo,

el cual pretende corroborar la información de campo y darle una explicación a dicho fenómeno.

#### Materiales y Métodos

Del banco de germoplasma de café ubicado en Cabiria - CATIE, se colectaron botones florales en diferentes etapas de desarrollo, de seis cultivares que presentan problemas de infertilidad masculina en el campo. El tamaño de dichos botones varió de 0.2 a 1.5 cm, dependiendo de la especie y se caracterizaron por una coloración verde los más pequeños, y una amarillo blancuzco los más grandes.

Los cultivares seleccionados pertenecen al grupo de cafés silvestres de Etiopía y se identifican por los números: 4520, 4662, 4624, 4621, 5759 y 4905. Todas las muestras fueron colectadas luego de las primeras lluvias, en las fechas correspondientes al 23 de mayo, 29 de mayo y 4 de junio de 1993, fijadas en FAA durante 48 horas, deshidratadas en una serie ascendente de alcohol y posteriormente infiltradas en parafina (CIRAD, 1989).

Una vez infiltradas se seccionaron a 8  $\mu$ m de grosor con un micrótopo de rotación. Las secciones se montaron en portaobjetos y se tiñeron con la técnica Safranina - Fast Green. Posteriormente fueron revisadas y fotografiadas al microscopio de luz.

#### Resultados y Discusión

Las anteras de menor tamaño (0.2 - 0.5 cm) en los 6 cultivares muestreados, se caracterizaron por la presencia de una masa de tejido fundamental, rodeada por una protodermis. Además, en las cuatro esquinas de la antera en desarrollo, se formaron pequeños grupos de células que se dividen periclinalmente y que constituyen las células esporógenas primarias (Flores, 1989 y Cronquist, 1984). Estas, se diferencian de las células vecinas, por presentar un núcleo de mayor tamaño y una coloración rojiza (Fig. 1).

Las anteras más desarrolladas mostraron una epidermis bien definida, así como un endotecio, con paredes muy gruesas. Estos engrosamientos que se depositan sobre las paredes anticlinales y tangenciales, parecen estar muy relacionadas con el mecanismo de dehiscencia de la antera (Weir *et al.*, 1990).

Bajo el endotecio hay usualmente, una o varias capas de células tubulares de paredes delgadas denominadas capas medias, las cuales se comprimen o destruyen durante la formación de microsporas. La capa interna de la pared del microsporangio, denominada tapete, puede colaborar en la nutrición de las microsporas, en la formación de la exina, o en la síntesis de algunos otros materiales (pollen kit) que confieren adhesividad a la pared del polen (Flores, 1989).

El tapete de los cultivares en estudio, es de tipo periplasmoidal, ya que se observa ruptura de paredes celulares y mezcla de esas células con las células madres del polen (Fig. 2). Los cortes histológicos, permitieron apreciar también que los cultivares 4662, 4624, 4759, 4621 y 4520, presentan granos de polen con apariencia normal. Estos granos se caracterizan por un tamaño que se mantiene uniforme entre los cultivares, además de su forma tricolpada y su tinción rojo intenso con safranina - Fast Green en comparación con los estériles, que son de menor tamaño y tiñen de color verde (Fig. 3).

Es importante mencionar que la mayoría de los cultivares estudiados presentaron cantidades apreciables de granos de polen aparentemente estériles entremezclados con los viables. Aunque no se hicieron estudios de germinación, la tinción aplicada brindó resultados confiables, ya que en ocasiones previas en que se utilizó junto con coloraciones para medir viabilidad, mostró resultados similares en cuanto a coloración de los granos de polen.

Solamente el cultivar 4905, se caracterizó por ausencia total de granos viables. Todos los estadios de desarrollo de la antera, mostraron únicamente granos pequeños, de apariencia frágil y coloración verdusca; dando la impresión de que su desarrollo se ve afectado durante las últimas etapas de maduración de la antera (Fig. 4). Sin embargo, cabe resaltar que la maduración de los tejidos que conforman la antera se lleva a cabo en forma normal, ya que inclusive se aprecia el tapete y el estómio.

No obstante, las causas de esterilidad de dichos granos pueden ser varias. Se cita, que el tapete es el que mantiene un balance delicado con la diferenciación del tejido esporógeno, y cualquier alteración en el produce la degeneración del polen. También mediante factores físicos o fisiológicos, el tapete puede inducir el aborto del polen. En este último proceso, puede influir además, el endotecio y el haz vascular del filamento (Flores, 1989).

Otros cultivares que mostraron alguna particularidad, fueron el 4624, donde se observó anteras con algunos de sus lóculos, lleno de polen no viable, mientras que otro de sus lóculos poseía granos viables. En el cultivar 4662, además de granos viables y no viables, se observó la presencia de algunos granos de polen que sobresalieron por su gran tamaño, dando la apariencia de diadas (Fig. 5). Los resultados anteriores coinciden con trabajos realizados por Da Cruz (1972), donde se cita que la fertilidad del polen varía según el cultivar. Además puede inferirse que debe haber otras causas que en el campo lleven a pensar que dichos cultivares son estériles. Sin embargo, paralelo a este trabajo, deben realizarse pruebas de germinación para los granos de polen encontrados.

**Literatura Citada**

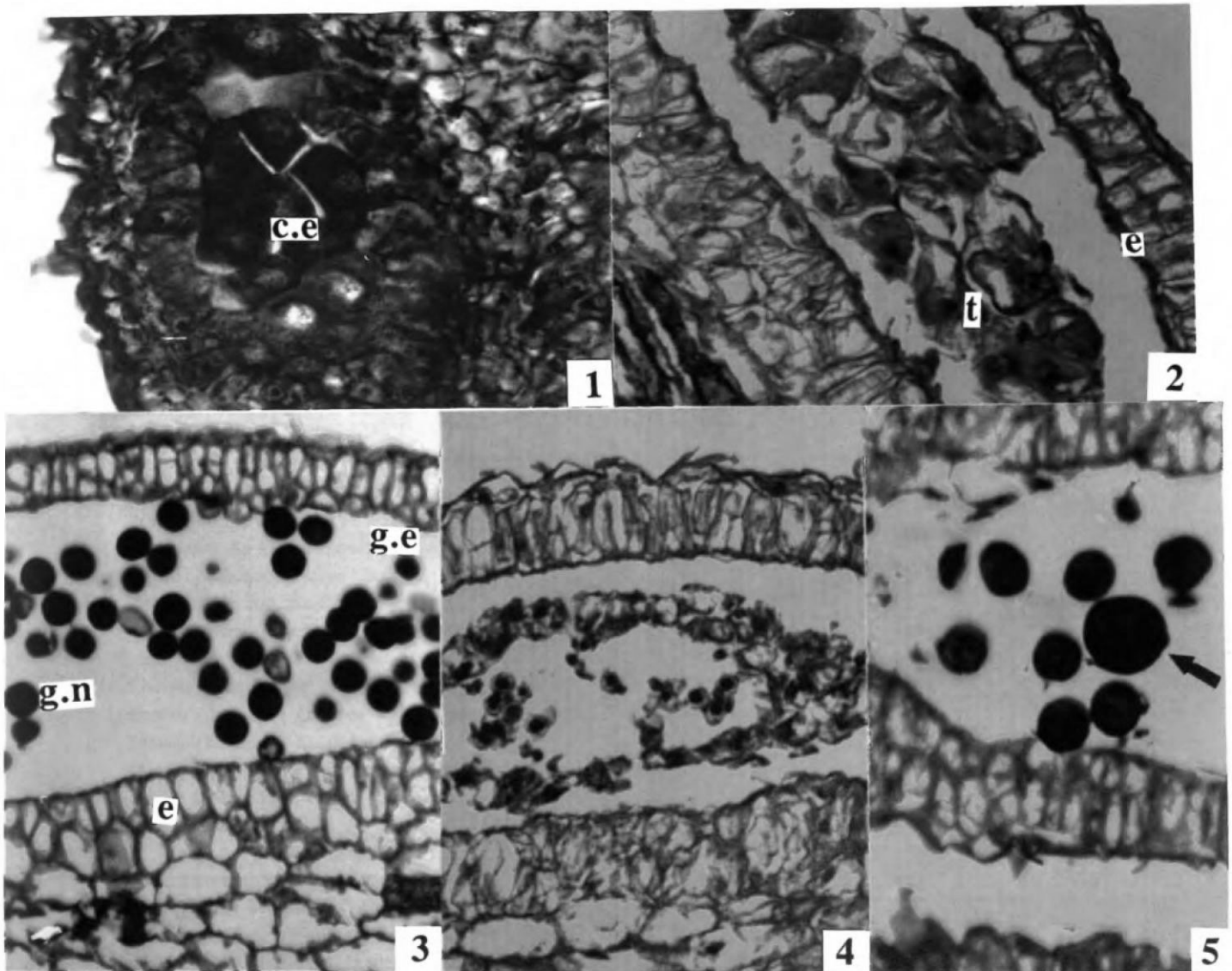
ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; DUFOUR, M.; ESCALANT, J.V. 1993. Evaluación y caracterización de los recursos genéticos de café conservados en el germoplasma del CATIE. XVI Simposio de Caficultura Latinoamericana. Managua, 25-29 Oct. 1993.

ANONIMOUS. 1989. Manuel pratique d'histologie végétale. Laboratoire de cytogenétique et d'histologie végétale. 61 p. CIRAD, Montpellier, Francia.

Da CRUZ, N. 1972. Aneuploides de café. Aspectos morfológicos e citológico na análise de duas progenies do café "Mundo Novo" (*Coffea arabica* L.). Tesis Ph.D. Sao Paulo, Brasil.

FLORES, E. 1989. La planta, estructura y función. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 501 p.

WEIR, E.; STOCKING, R.; BARBOUR, M. 1990. Botánica. Editorial Lumusa. México.



**Figura 1.** Sección transversal de antera de café en desarrollo. (c.e, células esporógenas).

**Figura 2.** Presencia de tapete periplasmoidal (e, endotecio; t, tapete).

**Figura 3.** Antera de café con granos de polen (g.n, grano normal; g.e, grano estéril; e, endotecio).

**Figura 4.** Sección longitudinal de la antera del cultivar 4905. Obsérvese la forma y coloración de los granos de polen.

**Figura 5.** Granos de polen del cultivar 4624. Nótese el desarrollo anormal de uno de ellos.

**OBSERVACIONES HISTOLOGICAS DE LA SUCEPTIBILIDAD Y/O RESISTENCIA EN**  
***Coffea arabica* Y *Coffea canephora* A *Meloidogyne incognita***  
**X. Peña, N. Vásquez, B. Bertrand**

**HISTOLOGICAL OBSERVATION OF SUSCEPTIBILITY AND/OR RESISTANCE OF *Coffea arabica* AND *Coffea canephora* TO *Meloidogyne incognita***

The purpose of this research was to evaluate the anatomical responses of *Coffea arabica* and *Coffea robusta* to *Meloidogyne incognita*'s attack. For that reason, plants were inoculated in the greenhouse fifteen days after transplanted to pots. It was observed the formation of multinucleate giant cells at the central cylinder level as well as hyperplasy and hypertrophy of evaluated materials.

**Introducción**

Las respuestas de la plantas, al ataque de los nematodos, son muy variadas y dependen no solamente de la composición química de la planta o tejidos atacados, sino también de la cantidad y cualidad de los materiales de secreción y excreción del nematodo (Giebel, 1982)

Dichas respuestas son generalmente clasificadas dentro de dos grandes categorías: resistencia y susceptibilidad; a pesar de que son términos relativos, ya que una planta puede comportarse como susceptible en un ambiente dado y mostrar resistencia en otro.

Frecuentemente la penetración de larvas se da tanto en plantas resistentes como en susceptibles. Las reacciones en plantas resistentes van desde la carencia de agallas y la penetración de un número reducido de larvas, hasta la necrosis celular que impide el desarrollo total del nematodo.

En plantas susceptibles, se notan varias categorías de respuesta, entre las que están la formación de células gigante multinucleadas en grupos de 5-9, el rápido desarrollo del nematodo, así como la abundante producción de masas de huevos (Dropkin y Nelson, 1960).

El objetivo del presente trabajo es el de estudiar las reacciones anatómicas de cafetos susceptibles y

moderadamente resistentes al ataque de *Meloidogyne*.

**Materiales y Métodos**

Materiales evaluados

La población de nematodo agallador utilizado en el experimento es procedente de una cepa recolectada en El Salvador, y corresponde a la especie *Meloidogyne incognita*, de acuerdo a un estudio morfométrico realizado por el Dr. Nahún Marbán de CATIE.

Los materiales evaluados pertenecen a híbridos de *Coffea canephora* variedad "Robusta", provenientes de la colección del CATIE, cuyos progenitores son:

Introducc. de Turrialba	Descripción	Procedencia
T-3561 (2-1)	Robusta L-48	Congo Belga
T-3757 (2-2)	Robusta SA-13	Indonesia
T-3755 (1-1)	Robusta BP-46A	Indonesia
T-3753 (1-1)	Robusta BP-29	Indonesia
T-3752 (1-3)	Robusta BP-25	Indonesia
T-3751 (1-2)	Robusta Bp-4A	Indonesia

- De testigo se utilizó el cultivar conocido como Pacas (*Coffea arabica*)

Inoculaciones y cantidad de inóculo

Las inoculaciones se realizaron 15 días después del trasplante de las plantas (estado de "patacón") a las macetas. Cada planta fue inoculada con una suspensión de 2000 huevos/planta/3 ml agua, la cual se vertió cerca de sus raíces. El sustrato utilizado fue una mezcla de arena y tierra esterilizada con calor y en proporción de 1:1.

Recuperación del inóculo

La extracción de huevecillos se realizó licuando las raíces de tomate durante 40 seg. en una solución de

hipoclorito de sodio (NaCl) al 0.05 %. Después se pasó la solución sobre los tamices de 200 y 500 mesh lavando con agua para eliminar el exceso de cloro (Anzueto, 1993). El tiempo de licuado y tamizado no sobrepasó los cuatro minutos.

### Estudios histológicos

Después de 4 meses de inoculado, se tomaron muestras de raíces de aproximadamente 0.5 cm., se fijaron en FAA durante 48 horas y se procedió a deshidratar en una serie ascendente de alcohol: 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % y 100 %, una hora en cada alcohol. Seguidamente se incluyeron en historesina durante 48 horas y se colocaron en moldes plásticos con una mezcla de historesina - endurecedor (10:1). Posteriormente se hicieron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un microtomo Sorvall, y se tificaron con azul de toluidina para ser observados al microscopio de luz.

### Resultados y Discusión

#### Cultivar Pacas

Los cortes transversales de raíces provenientes de este material, mostraron la presencia de juveniles en las células parenquimáticas cercanas a la epidermis. Dichas células sufren ruptura y destrucción, lo que crea verdaderas galerías que dan lugar a la entrada y avance de otros patógenos que contribuyen a aumentar la lesión. Algunas otras células cercanas a las dañadas, presentan un citoplasma con gran cantidad de granulaciones y un núcleo degenerado.

En células corticales es posible observar también, deposiciones de fenoles, así como el desarrollo de masas de huevos, envueltos en una matriz gelatinosa (Fig. 1). En ocasiones, dichas masas se desarrollan externamente, unidas a las células epidérmicas.

Asociados a las masas de huevos, se aprecian hembras grandes que son los que avanzan más internamente y favorecen la multiplicación y desarrollo de células (hiperplasia e hipertrofia), localizadas básicamente a nivel de xilema, aunque en ocasiones se afectan también las células adyacentes.

Estas células se caracterizan por un tamaño mayor al de sus vecinas; sin embargo, permanecen uninucleadas y con las demás características muy similares a las de su alrededor. En ocasiones se

rodean de un precipitado oscuro que se deposita alrededor de su pared y en los espacios intercelulares, dando la apariencia de una pared gruesa (Fig. 2).

Estudios realizados en el cultivo de Soya, mostraron que la pared de las células gigantes maduras consisten de una capa de material granular que reacciona positivo a celulosa y pectina, pero negativo a lignina, suberina y almidón (Dropkin y Nelson, 1960).

#### Híbridos moderadamente resistentes

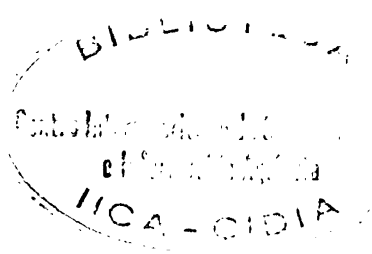
A pesar de que las evaluaciones en invernadero de este material, permiten clasificarlos como cultivares moderadamente resistentes en comparación con el testigo Pacas, los estudios histológicos muestran una reacción mayor que la observada en el testigo.

La lesión inicial es muy similar a la anteriormente descrita. Se observan juveniles a nivel del parénquima cortical, al igual que hembras con masas de huevos en diferentes etapas de desarrollo.

A diferencia del cultivar Pacas (*Coffea arabica*), se presentan células gigantes bien formadas que se localizan a nivel del cilindro vascular. Estas células sobresalen por su gran tamaño, su citoplasma denso y la presencia de hasta 7 - 8 núcleos alargados y con grandes cantidades de cromatina (Fig. 3). Dichas células actúan como una fuente de nutrientes para el desarrollo del nematodo (Paulson y Webster, 1970).

Las observaciones realizadas al microscopio de luz sugieren que una célula gigante se forma por la expansión de una célula simple. De acuerdo con Paulson y Webster (1970), durante la expansión, hay compresión y distorsión de células adyacentes, algunas de las cuales han sido rotas por el movimiento del nematodo a través de la planta. No obstante, otros investigadores señalan que las células gigantes se forman por rompimiento de las paredes celulares, dando como resultado la unión de células adyacentes y una serie de uniones endomitóticas (Rodhe y McClure, 1975).

Es importante hacer notar que de acuerdo a lo observado en los cortes, consideramos que lo que hay es expansión celular en lugar de ruptura de pared (Fig. 4).



Finalmente, es posible que el empleo de cultivares de especie diferente, en este trabajo, haya determinado la manifestación de dichas respuestas histológicas.

Es por ello importante, hacer estudios histológicos entre cultivares de la misma especie, para poder comparar la respuestas de ellos, ante la presencia del nematodo.

**Literatura Citada**

ANZUETO, F. 1993. Etude de la resitance du cafeir (*Coffea* sp.) a *Meloidogyne* spp. et *Pratylenchus* sp. These de Docteur. Montpellier, Francia. Ecole Nationale Superieure Agronomique de Rennes. IRCC-CIRAD.

RODHE, R.A. and McCLURE, M.A. 1975. Aautoradiography of developing syncytea in cotton roots infected with *Meloidogyne incognita*. Jour. Nematol. 7:64-69.

DROPKIN, U.; NELSON, P. 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. Phytopathology 50:442-447.

GIEBEL, H. 1982. Mechanism of resistance to plant nematodes. Ann. Rev. Phytopathol. 20:257-279.

PAULSON, R; WEBSTER, J. 1970. Giant cell formation in tomato roots caused by *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* (IV nematode) infection. A light and electron microscope study. Canadian Journal of Botany. 48:271-276.

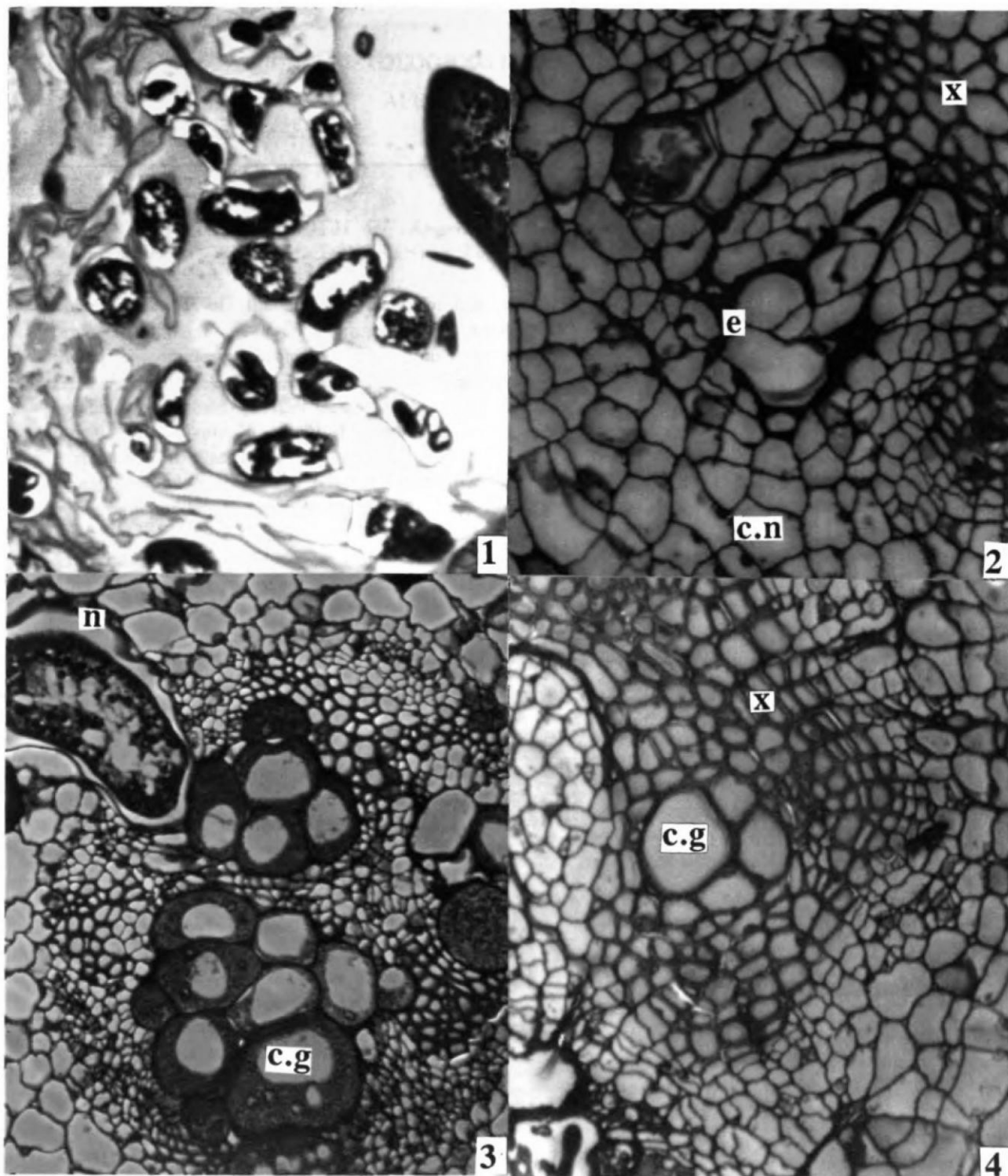


Figura 1. Masa de huevos de *Meloidogyne incognita*.

Figura 2. Células cercanas al xilema, mostrando hiperplasia e hipertrofia, así como engrosamiento de sus paredes (c.n, célula normal; e, engrosamientos; x, xilema).

Figura 3. Desarrollo de células gigantes (c.g, células gigantes; n, nematodo).

Figura 4. Desarrollo de célula gigante por expansión celular (c.g, célula gigante; x, xilema).

**ESTUDIOS HISTOLOGICOS DE RAICES DE *Aglaonema commutatum*  
AFECTADAS POR NEMATODOS**

N. Ortuño, N. Vásquez

**HISTOLOGICAL RESEARCH OF *Aglaonema commutatum* ROOTS NEMATODES INFECTED**

Since nematodes are the main problem for export ornamentals, *Aglaonema commutatum* plants were inoculated, under greenhouse conditions, with *Helicotylenchus californicus* and *Pratylenchus coffeae* populations. After forty five days of inoculation, plants histological responses were evaluated. It was observed that in both cases, nematodes had penetrated the internal root tissues, being more evident the species *Pratylenchus coffeae*.

The cell damages included brownish precipitates, bigger nucleus, presence of 2-3 nucleus and dense and granulated cytoplasm.

**Introducción**

En Costa Rica, las ornamentales de follaje que presentan las mayores demandas para la exportación son las del género *Aglaonema* (Coalición Costarricense de Iniciativa de Desarrollo -CINDE-1990). De ellas, la especie más comercializada es *Aglaonema commutatum* Schoott, cuyas variedades de mayor venta en el mundo corresponden a Silver Queen y María (Ramírez, 1992). Estos cultivos de exportación están severamente afectados por problemas fitosanitarios siendo los nematodos los más importantes en Costa Rica (Ramírez, 1992). *Pratylenchus* y *Helicotylenchus* son los géneros que con mayor frecuencia han sido observados en las *Aglaonemas* en la zona atlántica de Costa Rica (Flores y Marbán, 1992).

Se ha escrito bastante sobre el daño que ambas especies de nematodos causan en cultivos agrícolas; sin embargo, no se tiene mucho conocimiento sobre los efectos que ocasionan en plantas ornamentales.

Por esta razón, se realizó el presente trabajo, tendiente a evaluar los daños histológicos que causan los nematodos *Pratylenchus coffeae* y *Helicotylenchus californicus* en raíces de *Aglaonema commutatum* var María.

**Materiales y Métodos**

Se sembraron plantas de *Aglaonema* en macetas que tenían suelo esterilizado. Unas de esas plantas se utilizaron para la inoculación con *Pratylenchus* y otras, para inocularlas con *Helicotylenchus*.

Inoculación

Se seleccionaron plantas con un sistema radical bien desarrollado. De cada planta se tomaron las mejores raíces, cada una de las cuales se colocó individualmente en un frasco de vidrio con suelo esterilizado, sin desprenderlas de la planta madre. Posteriormente se inoculó cada frasco con una suspensión de 300 especímenes/ml de *Helicotylenchus* o *Pratylenchus*, según el tratamiento. A los 45 días después de la inoculación, se tomaron muestras por frasco para su correspondiente estudio histológico. Dichas muestras se fijaron en FAA durante 48 horas; se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol, y se infiltraron en parafina. Seguidamente, se hicieron cortes de 8  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con la técnica de safranina - fast green.

**Resultados**

Inoculación con *Helicotylenchus californicus*

La inoculación con juveniles de esta especie de nematodos, causó una decoloración de la planta, en comparación con el testigo.

Los estudios histológicos mostraron, que a diferencia de lo que se cita en la literatura, este nematodo puede comportarse como endoparásito, ya que penetra la epidermis y se establece entre la segunda y cuarta capa subepidérmicas causando ahí el daño (Fig. 1). No se observó penetración a capas más profundas del tejido radical. Resultados similares han sido informados para el cultivo de la soya, cuando se inocula con *Helicotylenchus dihystra* (Orbin, 1973).



La división periclinal de la células epidermales y el engrosamiento de la pared celular es una manifestación de las alteraciones a nivel de tejido radical. Esta podría ser una de las causas del engrosamiento de las raíces de *A. commutatum* en las áreas atacadas por *H. californicus*.

No hubo alteraciones apreciables en las células atacadas, pero si en las vecinas de las primeras lesiones. Estas células presentaron núcleos de mayor tamaño con dos o tres nucleolos y gran cantidad de cristales y granulaciones citoplasmáticas (Fig. 2). En las células menos atacadas se observó precipitados de color pardo. Estos constituyen un agravamiento del daño celular, lo cual probablemente afecte en forma directa las funciones de asimilación y translocación en la planta.

Fue posible observar muchas veces el desarrollo de estructuras fungales en las células epidérmicas. Con esto *H. californicus*, demuestra su capacidad de crear medios de acceso para otros organismos oportunistas del suelo y alterar el proceso de absorción de las plantas, como se presenta en otros cultivos (Román, 1978).

#### Inoculación con *Pratylenchus coffeae*

Se observó necrosamiento radical, amarillamiento del follaje y disminución de la altura de la planta. Los cortes de raíces mostraron destrucción de las células epidérmicas que sirven de entrada al nematodo. Una vez que éstos logran penetrar, independientemente de su estado de desarrollo, migran intracelularmente a través del parénquima cortical. Las lesiones aumentan gradualmente debido al avance alineado de grupos de nematodos en los tejidos más internos de la corteza, los cuales se desplazan en forma paralela al eje vascular; sin llegar a este (Fig. 3). Esto causa daños severos a la raíz, ya que se forman galerías que sirven de entrada a otros fitopatógenos, similar a los daños causados en *Citrus jambhiri* (Radewald *et al.*, 1971). Lo anterior demuestra su condición de endoparásito migratorio.

El hecho de que no se haya observado a *P. coffeae* ligado al tejido vascular puede ser una evidencia de que la destrucción final de la raíz es causada por otros organismos del suelo (Brodie, 1984).

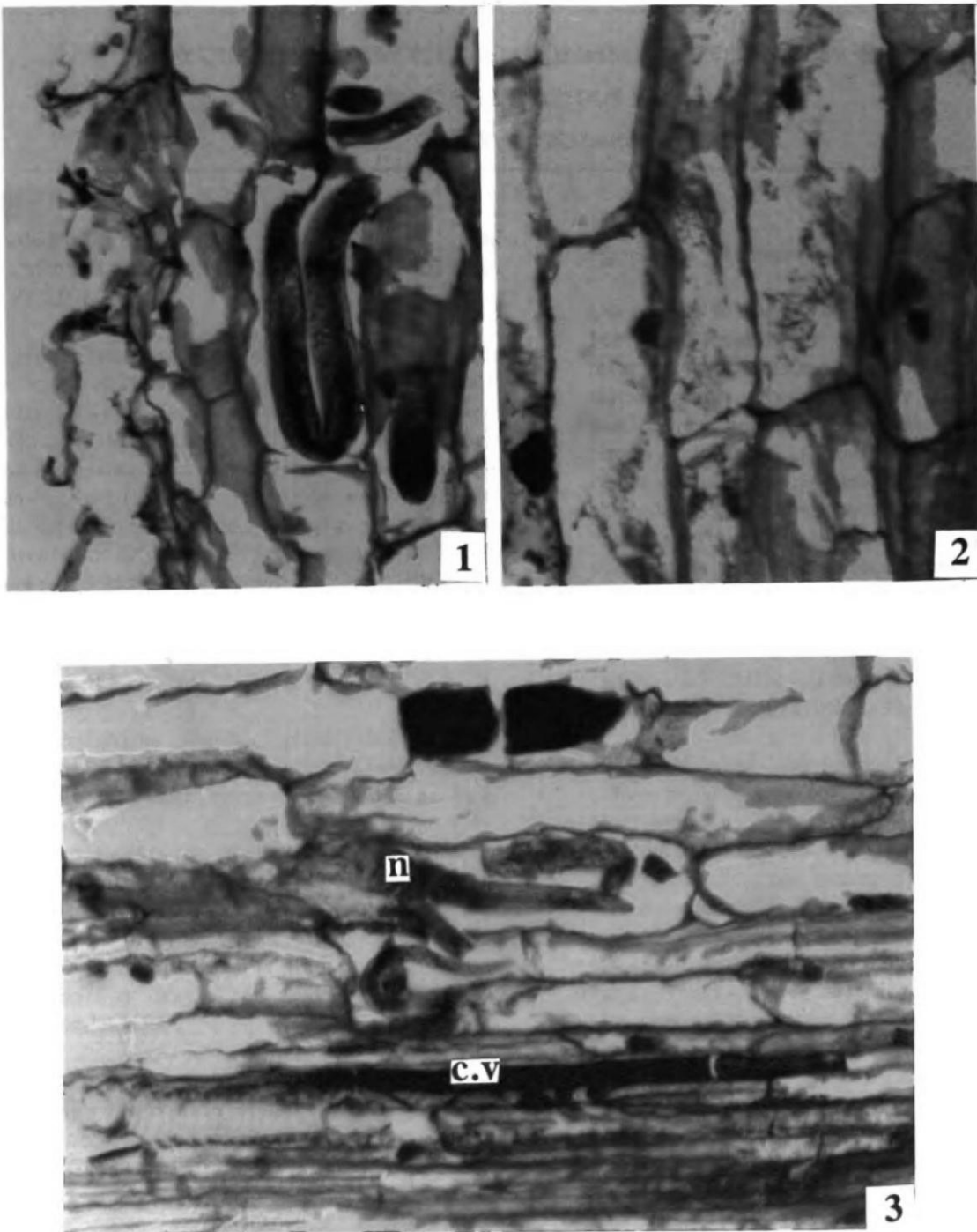
Finalmente, las células adyacentes a la cabeza del nematodo se caracterizan por presentar en algunos

casos lignificación de la pared celular, mientras que en otros se produce solo un ligero engrosamiento de la pared, sin lignificación. A nivel citoplasmático las células afectadas mostraron un contenido celular denso y granulado, de coloración oscura. Se observan además núcleos muy desarrollados y presencia de dos o tres nucleolos. Aunque los cortes de raíces utilizadas como testigo presentaron núcleos grandes de coloración rojiza, la de las células afectadas se caracterizaron por un tamaño aún mayor y una coloración violácea que los distinguen fácilmente de las células normales.

Estos resultados concuerdan con estudios realizados con *P. penetrans* en el cultivo del tomate (Friedman y Rohde, 1977).

#### Literatura Citada

- BRODIE, B.B. 1984. Root lesion nematodes. *In* Plant and insect nematodes. William R. Nickle. New York, USA. 193-199 p.
- FLORES, L. y MARBAN, N. 1992. Prospecciones fitonematológicas en ornamentales de follaje en Costa Rica. 4to. Congreso Internacional de manejo integrado de plagas. El Zamorano, Honduras. 116 p.
- FRIEDMAN, P. and ROHDE, R.A. 1977 Phenol levels of tomato cultivars infected with *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology* (EE.UU.). 9(3):257-259.
- ORBIN, D.P. 1973. Histology of soybean roots infected with *Helicotylenchus dihystera*. *Journal of Nematology* (EE.UU.). 5(1):37-40.
- RADEWALD, J.D.; O'BANNON, J.H. and TOMERLIN, T. 1971. Atomical studies of *Citrus jambhiri* roots infected by *Pratylenchus coffeae*. *Journal of Nematology* (EE.UU.) 3(4):409-416.
- RAMIREZ, J. 1992. Cultivo de *Aglaonema commutatum*. EUNED. San José, Costa Rica. 74 p.
- ROMAN, J. 1978. Fitonematología tropical. Estación Experimental Agrícola. Río Piedras, Puerto Rico. 255 p.



**Figura 1.** Presencia de *Helicotylenchus* en capas subepidérmicas.

**Figura 2.** Granulaciones citoplasmáticas en células corticales afectadas por nematodos.

**Figura 3.** Presencia de *Pratylenchus* cerca del cilindro vascular (c.v, cilindro vascular; n, nematodo).

## DETECCION NO RADIACTIVA DE GEMINIVIRUS EN TOMATE MEDIANTE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

G. Rivas, R. Lastra

### NON-RADIOACTIVE DETECTION OF GEMINIVIRUS IN TOMATO THROUGH DNA HYBRIDATION

A geminivirus was found affecting tomato plants in the areas of tacares, Grecia and Sarchí (Alajuela, Costa Rica). The virus was ected trough non-radioactive hybridization of nucleic acids using a probe prepared from the a strand of the Chino del tomato virus (CdTV). The probe was biotinylated and detected and detected using a non radioactive detection kit (PhotoGene™ System, BRL). Results showed positive signs when X-ray film was developed.

#### Introducción

Los geminivirus son un grupo viral de gran importancia biológica y económica caracterizados por poseer estructuras bisegmentadas de 20 x 30 nm.

Los geminivirus son transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) de una forma semi-persistente. Actualmente las infecciones originadas por estos virus son una limitante en la producción de cultivos alimenticios y textiles en regiones tropicales y subtropicales.

Las enfermedades inducidas por geminivirus son difíciles de diagnosticar debido a que no son fáciles de transmitir mecánicamente y además que no existe un suero específico para detectarlos mediante pruebas serológicas. Actualmente la técnica más confiable para un diagnóstico seguro es la hibridación de ácidos nucleicos. Esta prueba consiste en fijar a un sólido el ácido nucleico del virus de la planta conteniendo el ADN viral que se desea analizar. Posteriormente este ácido nucleico se hace reaccionar con una sonda la cual reconoce, en forma parcial o total, la parte homóloga del genoma viral.

#### Materiales y Métodos

Las pruebas se realizaron en marzo y junio del 1993. Muestras foliares de tomate provenientes de invernadero y de campos infectados mostrando una sintomatología aparentemente causada por geminivirus fueron colectadas en Tacares, Sarchí, Grecia y Alajuela (Alajuela, Costa Rica). Estas cuales se analizaron mediante la sonda CdTV (Virus chino del tomate), proporcionada por la Dra. Judith K. Brown (Universidad de Arizona, EE.UU.), y se visualizaron a través del procedimiento de detección PhotoGene™ (Fig. 1).

La sonda se marcó mediante la incorporación, a la cadena del ADN de un nucleótido precursor marcado con biotina (BRL 1990).

El ADN viral fue extraído por el método convencional usado por Rivas Platero (1993) y, Rodríguez y Rivas (1993). Muestras de aproximadamente 0.1-0.2 g de hojas jóvenes de tomate infectadas con geminivirus fueron maceradas en un mortero. El extracto de la savia fue transferido a un tubo Eppendorf™ de 1.5 ml mantenido en hielo, el cual se centrifugó durante 15 seg. a 10000 rpm. El ADN fue desnaturalizado por temperatura y neutralizado con 3 M acetato de sodio.

Se preparó la membrana de nylon PhotoGene™ cuadrículándola con áreas de 1 x 1 cm. En las cuadrículas de la membrana se ubicaron 3 µl de savia pura tratada de una dilución 1:5. La membrana se dejó secar al aire y fue colocada *in vacuo* en un horno, durante 2 horas. Una vez horneadas, se almacenaron en un desecador, para las pruebas posteriores (Rodríguez y Rivas 1993).

El procedimiento de hibridación se realizó de acuerdo a la metodología sugerida por BRL (1990) y Rivas Platero (1993).

Para la detección de la hibridación, las membranas se colocaron en un folder de detección PhotoGene™, agregándoles 0.01 ml/cm<sup>2</sup> del reactivo de detección. Después se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h, en un cuarto oscuro para detectar la luz emitida utilizando películas Kodak Ortho-M y Min-R para rayos-x. El tiempo de exposición varió de 30 min a 3 h.

La detección se determinó visualmente según la intensidad de las manchas grabadas en la película, ya que ésta es proporcional a la concentración de sonda hibridada presente en la memoria.

En todas las pruebas se utilizaron tres controles, El negativo consistió en un extracto de savia proveniente de plantas sanas y el positivo fue un macerado de savia de las plantas inoculadas en el invernadero con geminivirus. En el control absoluto se utilizó la solución NAEB, usada en la extracción de la savia.

### Resultados y Discusión

Los extractos de las muestras de tejido foliar infectado con geminivirus reaccionaron positivamente en la prueba de hibridación de ácidos nucleicos con la sonda CdTV. Los ácidos nucleicos virales extraídos fueron detectados tanto en soluciones de savia pura, como en diluciones 1:50 (Fig. 2).

El 12 % de las muestras presentó una reacción positiva fuerte (Cuadro 1). Los testigos, planta sana y amortiguador, reaccionaron negativamente.

La metodología utilizada permitió detectar la presencia de un geminivirus, transmitido pro mosca blanca, que afecta la producción de tomate en la principal zona productora de Costa Rica (Tacares de Grecia y Sarchí de Valverde Vega, en Alajuela). Asimismo, se demostró la factibilidad y confiabilidad del método, como herramienta para el diagnóstico de geminivirus en la región Centroamericana y el Caribe. Además, permite evitar los problemas ligados al uso de sondas radiactivas.

No obstante, a pesar de la eficacia en la detección, el requerir de pequeñas cantidades de muestra para el diagnóstico de los geminivirus y reutilizar las membranas una vez hibridadas, el método descrito presenta varios inconvenientes: - numerosas (50) horas de trabajo, - necesidad de un laboratorio, - personal capacitado, - sondas.

**Cuadro 1. Reacción de la sonda CdTV para la detección de geminivirus transmitido por mosca blanca en una prueba de hibridación de ácidos nucleicos con savia pura. Costa Rica, 1993.**

Muestra	Hospedante	Procedencia	Detección <sup>1</sup>
a1	Tomate	Sarchí	+
a2	Tomate	Sarchí	+
a3	Tomate	Sarchí	+
a4	Tomate	Sarchí	++
a5	Tomate	Sarchí	++
c1	Tomate	Tacares	+
c2	Tomate	Tacares	+
c3	Tomate	Tacares	++
c4	Tomate	Alajuela	+++
c5	Tomate	Alajuela	+++
e1	Tomate	Alajuela	-
e2	Tomate	Alajuela	+
e3	Tomate	Alajuela	+
e4	Tomate	Alajuela	++
e5	Tomate	Alajuela	++
g1	Tomate	CATIE	+
g2	Tomate	CATIE	+
g3	Tomate	CATIE	++
g4	Tomate	CATIE	++
g5	Tomate	CATIE	+++
i1,i2	Planta sana		-
i3,i4,i5	Amortiguador		-

<sup>1</sup> negativo (-), positivo débil (+), señal moderada (++) y positivo fuerte (alta intensidad) (+++).

## Literatura Citada

BRL. LIFE TECHNOLOGIES, INC. 1990. PhotoGene™ nucleic acid detection system. Instruction Manual. N.Y. 26 p.

HAASE, A.; BRAHIC, M.; STOWRING, L.; BLUM, H. 1984. Detection of viral nucleic acids by *in situ* hybridization. In *Methods in Virology*. K. Maramorosch and H. Koprowski, eds. Vol. VII. Orlando, Academic Press. P. 189-226.

RIVAS PLATERO, G.G. 1993. Detección de geminivirus en tomate mediante hibridación de ácidos nucleicos y manejo de semilleros para reducir la incidencia de virosis transmitidas por *Bemisia tabaci* (Gennadius) en el campo. Tesis M.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 92 p.

RODRIGUEZ, H.; RIVAS, G.G. 1993. Hibridación y detección de fitovirus con PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 8 p. (Mimeografiado).

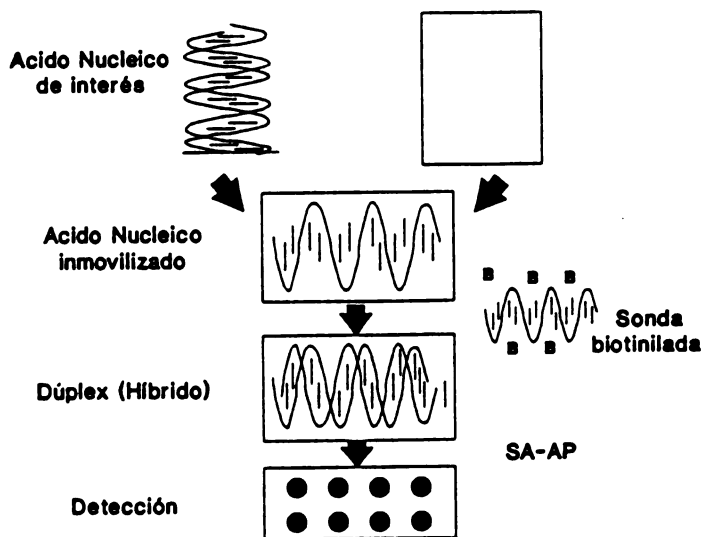


Figura 1. Sistema de detección PhotoGene™ para ácidos nucleicos. (Adaptado de BRL 1990).

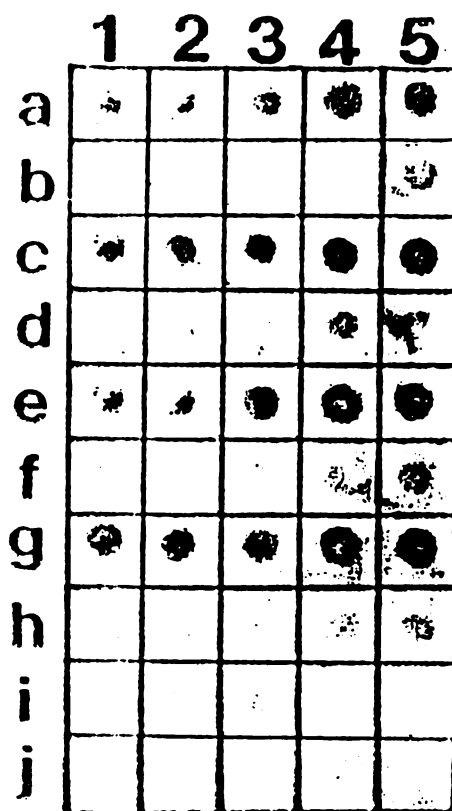


Figura 2. Detección de geminivirus en tomate mediante la hibridación de ácidos nucleicos usando la sonda CdTV. Sarchí de Valverde Vega (a, b), Tacares de Grecia (c, d), Alajuela (Estación Fabio Baudrit) (e, f), CATIE (Invernadero) (g, h), Testigos (i, j), a, c, e y g = savia concentrada, b, d, f y h = dilución 1:50.

***Pasteuria penetrans*: ADHERENCIA Y PARASITISMO EN**

***Meloidogyne incognita* Y *Meloidogyne arabidica***

**T. Rojas, N. Vásquez, N. Marbán**

***Pasteuria penetrans*: ADHERENCE AND PARASITISM IN *Meloidogyne incognita* AND *Meloidogyne arabidica***

The utilization of *Pasteuria penetrans* as nematodes biocontrol agent, is progressing rapidly. The purpose of the present research was to evaluate the behavior of two *Meloidogyne* species regarding the above mentioned bacterium and the histological effects that such nematodes can cause to tomato roots. After measuring the juveniles bacterium adherence and the number of infected juveniles, the values obtained were higher for *M. incognita* species. It was also observed that plants inoculated with *Meloidogyne* + *P. penetrans* produced less galls. Histological cuts showed giant cells development.

Los nematodos son organismos que causan una serie de enfermedades en diversos cultivos. Durante mucho tiempo su combate ha sido a través de sustancias químicas muy tóxicas y que causan gran deterioro al ambiente.

Es por ello, que recientemente se vienen desarrollando otras técnicas, tendientes a dar un manejo adecuado a estos organismos. Así, además de las prácticas culturales ampliamente conocidas, el control biológico con hongos y bacterias ha sido de gran utilidad. Existen muchas especies de hongos, enemigos de nematodos fitoparásitos; no obstante, el único caso bien documentado de una bacteria parasitando nematodos es *Pasteuria penetrans*, la cual tiene un gran potencial como agente biocontrolador (Zavaleta, 1985).

Es por ello, que se desarrolló el presente trabajo tendiente a evaluar el comportamiento de 2 especies de *Meloidogyne* ante la presencia de la bacteria *P. penetrans*, así como los efectos histológicos de dichos nematodos en raíces de tomate.

**Materiales y Métodos**

El trabajo se realizó en los Laboratorios de Histología vegetal y Nematología, así como en los invernaderos del CATIE. Las fotografías al Microscopio Electrónico de rastreo se tomaron en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

Con el fin de contar el número de esporas de *Pasteuria penetrans*, adherida al cuerpo de los nematodos, se colocaron segundos estadios juveniles (J.2) de *Meloidogyne arabidica* y *Meloidogyne incognita* en una suspensión de 1.000000 de esporas/ml y se tomaron muestras de 20 nematodos, cada 2 horas durante 24 horas.

Se evaluó además el efecto de *P. penetrans* en el desarrollo de *M. arabidica* y *M. incognita* en raíces de tomate, bajo condiciones de invernadero. Para ello, se sembraron plantas de tomate susceptibles a *Meloidogyne* en macetas a las que se les inoculó 1000 juveniles y huevos extraídos de raíces por el método de hipoclorito de sodio (Ferris, 1985). Luego se aplicaron a dichas macetas, 2.000000 esporas/ml.

Después de 7 semanas, se extrajo la población de nematodos de la raíz y del suelo, a través del método de licuado y tamizado para los nematodos de la raíz, y del método de tamizado centrifugado y flotación en solución azucarada (Jenkins, 1964) para los del suelo. Con el fin de observar el grado de parasitismo de la bacteria se colectaron 140 hembras maduras de cada una de las dos especies y se comprimieron sobre 1 portaobjetos para su observación al microscopio de luz. Muestras de raíz afectadas por nematodos, fueron procesadas para su observación histológica utilizando los métodos convencionales de fijación e infiltración en parafina y resina.

## Resultados y Discusión

Existieron diferencias en la cantidad de esporas adheridas a la cutícula de las 2 especies de nematodos.

Así, *M. incognita* mostró una mayor cantidad de juveniles con esporas de *P. penetrans* adheridas, así como un mayor número de esporas por juvenil que *M. arabicida*. Los promedios de adherencia obtenidos, muestran que es muy probable que pueda ocurrir infección de *P. penetrans*, ya que de acuerdo con Stirling (1984), son suficientes cinco esporas para asegurar dicha infección.

Las observaciones al M.E.B. mostraron que no hay preferencia de la bacteria hacia alguna región del nematodo (Fig. 1).

Por otro lado, la inoculación de juveniles (J.2) más esporas a plantas de tomate, mostró diferencias significativas en los porcentajes de agallamiento de las plantas que tenían únicamente juveniles de *Meloidogyne*, con respecto a los que tenían *Meloidogyne* + *Pasteuria*. En estas últimas, se redujo en un 50 % dicho porcentaje, lo que demuestra que *P. penetrans* tiene potencial para ser usado como un nematocida biológico, lo que coincide con trabajos previos (Stirling, 1984; Dube y Smart, 1987).

Los estudios de población final de *M. incognita* y *M. arabicida* en raíces de tomate mostraron una mayor población para *M. incognita*. Sin embargo, ésta capacidad de incremento en la población se reduce al aplicar *P. penetrans*. Estudios realizados por Bird y Brisbane (1988), mostraron que la capacidad reproductiva de los nematodos fue mucho menor en suelos infestados con *P. penetrans*.

La observación de hembras parasitadas, reveló la presencia de endosporas y la ausencia de masas de huevos (Fig. 2).

Finalmente, los cortes histológicos permitieron observar que ambas especies de nematodos inducen la formación de gran cantidad de células gigantes multinucleadas, que se localizan cerca y dentro del tejido vascular. También, es frecuente observar la presencia de nematodos dentro del tejido cortical, no obstante, el daño principal ocurre dentro del cilindro vascular. Se observó además, que una vez que el nematodo ha penetrado la raíz, ocurre la invasión de

otros microorganismos sobre todo hongos, que se alojan inclusive en las células gigantes (Fig. 3 y 4).

## Literatura Citada

BIRD, A.F.; BRISBANE, P.G. 1988. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soil and the reproduction of root-knot nematodes. *Revue de Nematologie* 11:75-81.

DUBE, B and SMART, G.C. Jr. 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematologie* 10:285.

FERRIS, H. 1985. Modelos para la predicción de pérdidas en cosechas y decisiones en el manejo. In: Zuckerman, M.B.; Mai, F.W. y Harrison B.M. *Manual de Laboratorio*. Trad. al español por Marbán, M.N. Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Publicado por CATIE, Turrialba, Costa Rica.

JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation. Technique for separating nematodes from soil. *Plant disease Reporter* 48(9):692.

STIRLING, R.G. 1984. Biological control of *Meloidogyne arabicida* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74:55-60.

ZAVALETA, . 1985. Las bacterias como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos. In Marbán, N.M., Thompson, I.A. *Fitonematología avanzada I*. Departamento Editorial del Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. p 195-214.

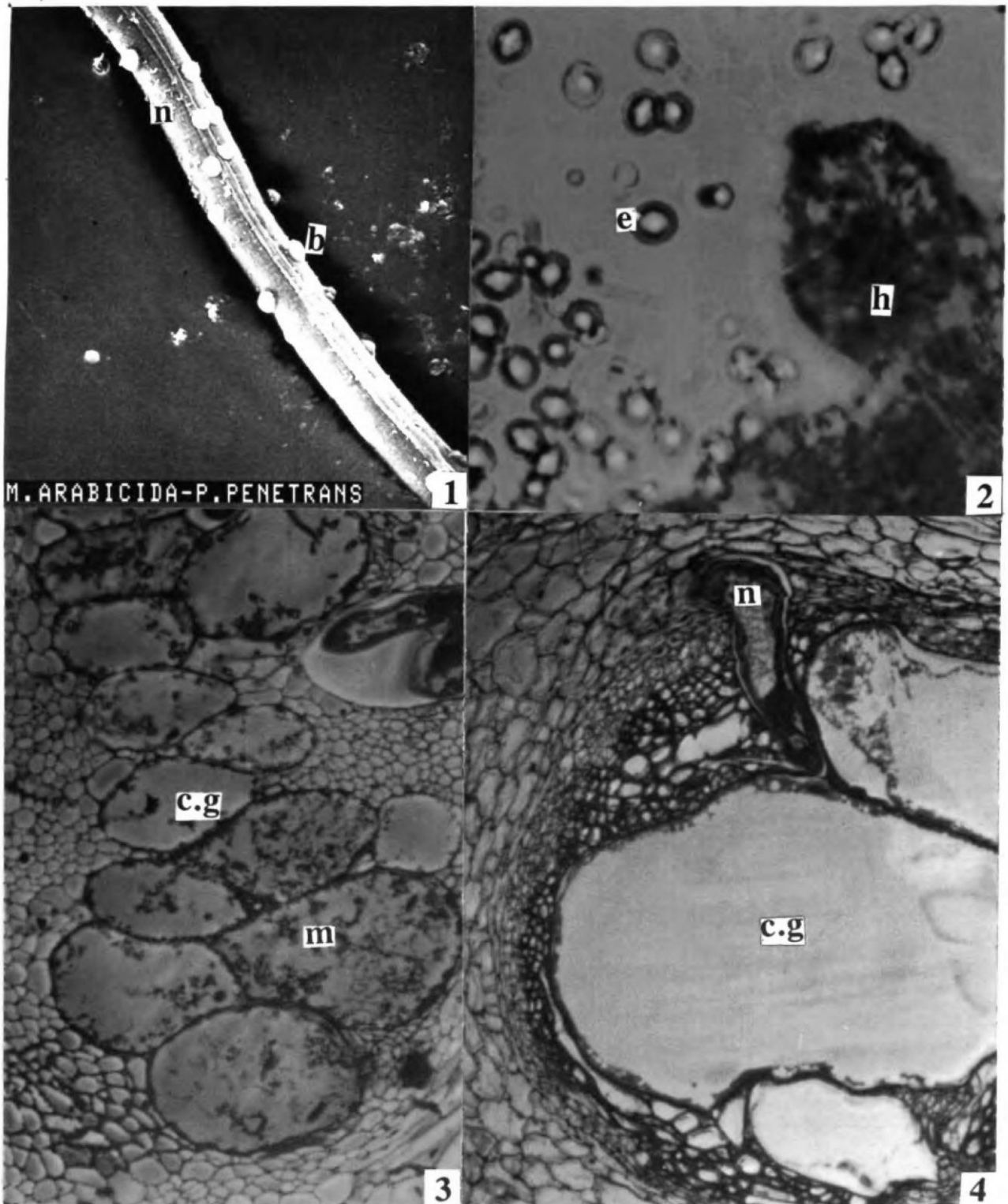


Figura 1. Adherencia de *P. penetrans* a juveniles de *Meloidogyne* (b, bacteria; n, nematodo).

Figura 2. Presencia de endosporas en hembras parasitadas (e, endosporas; h, hembra).

Figura 3 y 4. Desarrollo de células gigantes en raíz de tomate. Nótese el crecimiento micelial dentro de ellas (c.g, células gigantes; m, micelio; n, nematodo).