

**SYMPOSIUM CIRAD/CATIE
AMELIORATION GENETIQUE ET
DEVELOPPEMENT DES CULTURES TROPICALES**

**20 au 29 Novembre 1995
CATIE, Turrialba, Costa Rica**

**SIMPOSIO CIRAD/CATIE
MEJORAMIENTO GENÉTICO Y
DESARROLLO DE LOS CULTIVOS TROPICALES**

**20 al 29 de Noviembre 1995
CATIE, Turrialba, Costa Rica**

Cher(s), Chère(s) Collègues,

C'est pour marquer 10 ans de collaboration scientifique et technique entre le CIRAD et le CATIE, que nous avons voulu organiser ce symposium sur l'Amélioration Génétique et le Développement des Cultures Tropicales. Cette manifestation scientifique ne prétend pas illustrer tout ce qu'a été la collaboration scientifique entre nos deux institutions depuis 1985, mais seulement en donner un bref aperçu et surtout consolider et définir les nouvelles bases de notre coopération dans les années à venir.

Les activités que nous avons menées depuis 10 ans sont diverses et variées tant dans leurs thématiques - amélioration génétique, phytoprotection, météorologie, télédétection, café, cacao, banane plantain - que dans leur cadre - recherches, développement, enseignement-.

Toute cette collaboration a été renforcée par l'aide de différents organismes de recherches et de financement dont il serait difficile de faire une liste complète sans omettre personne, et que nous remercions vivement pour l'apport important qu'ils nous ont apporté dans la lutte constante que nos deux entreprises ont entrepris pour l'amélioration de l'agriculture tropicale et donc de la qualité de vie des populations des pays en voie de développement.

Nous remercions toutes les institutions qui ont permis la réalisation de ce symposium, le Gouvernement Français (MAE-DRCST), l'IICA-PROMECAFE, l'ORSTOM, l'INRA, l'Union Européenne, l'IPGRI à travers son bureau de Cali, Colombie et de l'INIBAP, le CRBP au Cameroun, l'Université Nationale du Costa Rica, la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux et l'Université Catholique de Leuven en Belgique.

Ce document comporte les résumés des intervenants qui nous font l'honneur de participer à l'exception de quelques uns qui seront remis durant le déroulement du séminaire.

A tous chère(s) et cher(s) collègues un grand merci pour votre participation et la collaboration que vous avez toujours veillée à développer avec enthousiasme et qualité et nous espérons que vous pourrez continuer à le faire dans les années à venir.

Estimado(s), Estimada(s) Colegas,

Con el objetivo de celebrar los 10 años de colaboración científica y técnica entre CIRAD y CATIE quisimos organizar este simposio sobre Mejoramiento genético y Desarrollo de los Cultivos Tropicales. Este evento científico no pretende ilustrar toda la colaboración que ha existido entre nuestras dos instituciones desde 1985, sino solamente dar una breve ojeada y sobre todo consolidar y definir las nuevas bases de nuestra futura cooperación.

Las actividades que desarrollamos desde hace 10 años son diversas y variadas tanto en sus temáticas - mejoramiento genético, fitoprotección, meteorología, teledetección, café, cacao, plátano - como en su marco - investigación, desarrollo y enseñanza.

Toda esta colaboración fue reforzada por diferentes organismos de investigación y financiamiento, cuya lista sería difícil de hacer completa sin temor de omitir a alguien, a quienes agradecemos mucho por el aporte importante que nos brindaron en la lucha constante que nuestras dos empresas desarrollan para mejorar la agricultura tropical y la calidad de vida de los pueblos de los países en vía de desarrollo.

Agradecemos a todas aquellas instituciones que permitieron la realización de este simposio, el gobierno Francés (MAE-DRCST), el IICA-PROMECAFE, la ORSTOM, el INRA, la Unión Europea, el IPGRI mediante su oficina regional en Cali y el INIBAP, el CRBP en Cameroun, la Universidad Nacional de Costa Rica, la Facultad de Ciencias Agronómicas de Gembloux y la Universidad Católica de Leuven en Bélgica.

Este documento reúne los resúmenes de los conferencistas que nos hacen el honor de participar, con excepción de algunos que se entregarán durante el desarrollo del evento.

A todos, Estimada(s) y Estimado(s) colegas muchas gracias por su participación y su colaboración que siempre desarrollaron con entusiasmo y calidad y esperamos que puedan continuar haciéndolo en los años futuros.

Nelly Vasquez
Responsable du laboratoire de Culture de Tissus
Responsable del Laboratorio de Cultivos de tejidos
CATIE

Jean-Vincent Escalant
Chef de l'Unité de Biotechnologie
Jefe de la Unidad de Biotecnología
CATIE/ CIRAD-FLHOR

PROGRAMA CIENTÍFICO/ PROGRAMME SCIENTIFIQUE

Domingo 19 de Noviembre *Dimanche 19 novembre*

llegada de los participantes
Arrivée des participants

Lunes 20 de Noviembre *Lundi 20 novembre*

- | | | |
|--|---|--|
| 9:00 | Discurso de Bienvenida/ <i>Discours de Bienvenue</i> Palabras del Director Científico CATIE (10') <i>Intervention du Directeur Scientifique</i> Palabras del Representante del IICA (10') <i>Intervention du Représentant de l'IICA</i> Palabras del Representante del INIBAP (10') <i>Intervention du Représentant de l'INIBAP</i> | Marikis Alvarez R. Jaramillo |
| 9:30 | Café | |
| 10:00 | Palabras del Representante del MAE (10') <i>Intervention du Représentant du MAE</i> Palabras del Representante CIRAD-LAC (10') <i>Intervention du Représentant CIRAD-LAC</i> Palabras del Director General del CATIE (10') <i>Intervention du Directeur Général du CATIE</i> | G. Christophe J. Laboucheix R. Guevara |
| 10:30 | Organización/ <i>Organisation</i> | J.V. Escalant |
| MEJORAMIENTO GENÉTICO/ AMELIORATION GENETIQUE | | |
| Chairman: Dr H. Tezenas Du Montcel Rapporteur: Msc. W. Phillips | | |
| 10:45 | El mejoramiento de las plantas tropicales ✓ <i>L'amélioration génétique des plantes tropicales</i> | J. Schwendiman |
| 11:15 | RECURSOS GENÉTICOS/ <i>RESSOURCES GENETIQUES</i> Cartografía del genoma de los bananos <i>Cartographie le génome des bananiers</i> | P. Lagoda |
| 11:45 | Discusión/ <i>Discussion</i> | |
| 12:00 | Almuerzo/ <i>Déjeuner</i> | |
| 13:30 | Estudio molecular de los recursos genéticos del café <i>Etude moléculaire des ressources génétiques du caféier</i> | F. Anthony |
| 14:00 | Los marcadores moleculares en cacao en CATIE <i>Les marqueurs moléculaires sur cacao au CATIE</i> | W. Philipps |
| 14:30 | Café | |
| 15:00 | El mejoramiento genético de los bananos <i>L'amélioration génétique des bananiers</i> | F. Bakry - C. Jenny |
| 15:30 | El mejoramiento genético de los plátanos en el CRBP: objetivos, estrategias y resultados <i>L'amélioration génétique des bananiers plantains au CRBP: Objectif, Stratégies et Résultats</i> | K. Tomekpe - E. Auboiron |
| 16:00 | El mejoramiento genético de <i>Coffea arabica</i> en América Central <i>L'amélioration génétique de Coffea arabica en Amérique Centrale</i> | B. Bertrand - F. Anthony |
| 16:30 | El mejoramiento genético de lapiña <i>L'amélioration génétique de l'ananas</i> | G. Coppens |
| 17:00 | Discusión/ <i>Discussion</i> | |
| 17:30 | Fin de sesión/ <i>Fin de session</i> | |
| 18:00 | Regreso WAGELIA/ <i>Retour au WAGELIA</i> | |
| 19:30/ 21:00 | Cocktail "Club de CATIE" | |

Martes 21 de Noviembre *Mardi 21 novembre*

LOS HAPLOMETODOS (ATP-CIRAD)/ LES HAPLOMETHODES (ATP-CIRAD)

Chairman: Dr F. Bakry
Rapporteur: D. Filloux

- 8:00 Conferencia: Pathways to haploidy **C. Raquin**
Conférence: Les voies de passage vers l'haploïdie
- 8:45 Androgénesis del banano **F. Bakry - F. Kerbellec**
Androgénèse chez le bananier
- 9:15 **Café**
- 9:45 Ginogénesis inducida en el banano **J.V.Escalant-H.LebLANC-**
Gynogénèse induite chez le bananier **J.L.Moreno**
- 10:15 El cultivo de anteras para el mejoramiento del arroz en el CIRAD-CA **D. Filloux-B.Courtois-**
La culture d'anthère pour l'amélioration du riz au CIRAD-CA **E.Guiderdomi**
- 10:45 Resultados recientes sobre la obtención de plantas a través del cultivo de anteras **M. Dufour- María del R. Jimenez**
Résultats récents sur l'obtention de plantes par culture d'anthères de Coffea arabica
- 11:15 **Discusión / Discussion**
- 12:00 **Almuerzo/ Déjeuner**
- 13:30 **ATP-CIRAD/ HAPLOMETODOS- ATP-CIRAD/HAPLOMETHODES**
Discusión, conclusión/ *Discussion, conclusion* **F. Bakry (Chairman)**
- 15:00 **Café**
- 15:30 **ATP-CIRAD/ HAPLOMETODOS- ATP-CIRAD/HAPLOMETHODES**
Discusión, conclusión/ *Discussion, conclusion* **F. Bakry (Chairman)**
- 17:00 **Fin de sesión/ Fin de session**
- 17:30 **Regreso WAGELIA/ Retour WAGELIA**

Miércoles 22 de Noviembre *Mercredi 22 novembre*

Día de Campo / Journée au champ

Miércoles 22 de Noviembre *Mercredi 22 novembre*

LOS SISTEMAS DE REGENERACIÓN IN VITRO/ LES SYSTEMES DE REGENERATION IN VITRO

Chairman: Dr C. Teisson
Rapporteur: Dr H. Schoofs

- 8:00 Desarrollo de un sistema sencillo de cultivo *in vitro* por inmersión temporal. **C. Teisson**
Développement d'un système simple de culture in vitro par immersion temporaire
- 8:30 Regeneración por embriogénesis somática a partir de flores masculinas de bananos **J.V. Escalant et al.**
y plátanos: I. Amplificación por inmersión temporal.
Régénération par embryogenèse somatique à partir de fleurs mâles de bananier
et plantain: I. Amplification par immersion temporaire
- 9:00 **Café**
- 9:30 La embriogénesis somática del café, una herramienta para el mejoramiento genético. **M. Dufour**
L'embryogenèse somatique du caféier, un outil pour l'amélioration génétique
- 10:00 Regeneración por embriogénesis somática a partir de flores masculinas de bananos **F. Cote et al.**
y plátanos: II. Suspensiones celulares.
Régénération par embryogenèse somatique à partir de fleurs mâles de bananier et
plantain: II. Suspensions cellulaires.
- 10:30 Suspensiones celulares de *Musa* y sus aplicaciones: resultados recientes. **H. Schoof et al.**
Suspensions cellulaires de Musa et ses applications: résultats récents

- 11:00 Cultivo de suspensiones de células y de protoplastos en arroz
Culture de suspensions cellulaires et de protoplastes de riz E. Guiderdoni et al.
- 11:30 La histología en apoyo al cultivo de tejidos ✓
L'histologie en appui aux cultures de tissus N. Vásquez
- 12:00 Almuerzo/ Déjeuner

LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Chairman: Dr E. Guiderdoni

Rapporteur: Dr M. Dufour

- 13:30 La transformación genética de bananos y plátanos por bombardeo de partículas:
I. Transformación de suspensiones celulares
La transformation génétique des bananiers par bombardement de particules:
I. Transformation de suspensions cellulaires F. Cote
- 14:00 II. Transformación de embriones somáticos
II. Transformation d'embryons somatiques J.V. Escalant
- 14:30 Café
- 15:00 La transformación genética del arroz por tratamiento de protoplastos con PEG
y aceleración de partículas sobre scutellum de embriones inmaduros
La transformation génétique du riz par traitement de protoplastes au PEG
et accélération de particules dans le scutellum d'embryons immatures H.Chair et al. (E. Guiderdoni)
- 15:30 Transformación de variedades de arroz *indica* en Costa Rica
La transformation de variétés de riz indica en Costa Rica Ana Mercedes - Marta Valdez
- 16:00 **Discusión / Discussion**
- 16:30 La problemática regional del cultivo de los bananos de consumo doméstico
La problématique régionale de la culture des bananiers de consommation domestique T. Lescot
- 17:00 **Discusión / Discussion**
- 18:00 **Retour WAGELIA**

Viernes 24 de Noviembre Vendredi 24 novembre

- 8:00 Visita de la Unidad de Biotecnología del CATIE
Visite de l'Unité de Biotechnologie du CATIE N.Vasquez
- 9:30 Café
- 10:00 Visita en las colecciones vivas - CABIRIA
Visite des collections au champ C. Astorga
- 12:00 Almuerzo/ Déjeuner

VARIABILIDAD DE LAS POBLACIONES PATOGENAS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS POBLACIONES PATOGENAS VARIABILITE DES POPULATIONS PATHOGENES ET MECANISMES DE RESISTANCE DES POPULATIONS PATHOGENES

Chairman: Dr X. Mourichon

Rapporteur: Dr F. Jimenez

- 13:30 Estructura global de las poblaciones del hongo de la raya negra del banano,
Mycosphaerella fijiensis.
Structure de la population globale de la maladie des raies noires du bananier,
Mycosphaerella fijiensis J. Carlier - X. Mourichon
- 14:00 Evidencia de compuestos polifenólicos constitutivos en la resistencia
(parcial/horizontal resistencia) del banano a *Mycosphaerella fijiensis*.
Evidence d'une composante polyphénolique constitutive dans la résistance
(partielle/horizontale) du bananier à Mycosphaerella fijiensis X. Mourichon - J. Carlier
- 14:30 Café
- 15:00 Estudio de elicitors asociados a la resistencia del cultivar yangambi Km5 a
Mycosphaerella fijiensis Morelet. P. Lepoivre- Riveros-Angarita

Etude d'éliciteurs associés à la résistance du cultivar de bananier yangambi km5à Mycosphaerella fijiensis Morelet.

- 15:30 Susceptibilidad varietal y determinismo genético de la resistencia a la sigatoka negra de los bananos.
Sensibilité variétale et déterminisme génétique des résistances à la Cercosporiose noire des bananiers
- 16:00 Estudio de la distribución de la Sigatoka negra y amarilla en Costa Rica
Etude de la distribution des Cercosporioses jaune et noire au Costa rica
- 16:30 El control biológico de la Sigatoka negra
Le contrôle biologique de la Cercosporiose noire
- 17:00 El control bio-climático de la Sigatoka negra en plátano
Le contrôle bio-climatique de la Cercosporiose noire sur bananier plantain
- 17:30 **Fin de sesión/ Fin de session**
- 18:00 **Regreso WAGELIA/ Retour WAGELIA**

E. Fouré - K. Tomekpe

A.C. Tapia

E. Bustamante

F. Jiménez

Sabado 25 y Domingo 26 de Noviembre - Samedi 25 et Dimanche 26 novembre

Libre

Lunes 27 de Noviembre - Lundi 27 novembre

NUEVAS PERSPECTIVAS DE COLABORACIÓN/ NUEVAS PERSPECTIVAS DE COLABORACION

Chairman: Dr N. Alvarez
Rapporteur: Msc. N. Vasquez

- 8:00 El mejoramiento genético de los árboles forestales ✓
L'amélioration génétique des arbres forestiers
- 8:30 El programa Manejo de los bosques en CATIE
Le programme de conduite des forêts au CATIE
- 9:00 Sistema de Información geográfica en CATIE
Le Système d'information Géographique au CATIE
- 9:30 **Café**
- 10:00 Visita al Centro de Cómputo: SIG / *Visite au Centre Informatique: SIG*
- 12:00 **Almuerzo/Déjeuner**
- 13:30 Síntesis del proyecto "CEE-STD3"
Synthèse du projet "CEE-STD3"
- 15:00 **Café**
- 15:15 Síntesis del proyecto "CEE-STD3"
Synthèse du projet "CEE-STD3"
- 17:00 **Fin de sesión/ Fin de session**
- 18:00 **Regreso WAGELIA/ Retour WAGELIA**

J. Cornelius ✓

J.J. Campos - B. Finegan ✓

G. Leclerc ✓

Martes 28 de Noviembre - Mardi 28 novembre

LAS ACCIONES EN REDES/ LES ACTIONS EN RESEAUX

Chairman: Sr G. Christophe
Rapporteur: Msc. T.Lescot

- 8:00 Hacia una cooperación reforzada del CIRAD en América Latina:
el ejemplo del CIRAD-FLHOR en plátano y frutales
*Vers une coopération renforcée du CIRAD en Amérique Latine:
l'exemple du CIRAD-FLHOR sur les bananiers plantains et les cultures fruitières*

J. Ganry

| | | |
|--------------|---|------------------------------|
| 8:30 | La política de valorización del programa de banano del CIRAD-FLHOR <i>La politique de valorisation du programme Bananier au CIRAD-FLHOR</i> | H. Tezenas du Montcel |
| 9:00 | Las acciones de la red INIBAP-LAC <i>Les actions du Réseau INIBAP-LAC</i> | R. Jaramillo |
| 9:30 | Café | |
| 10:00 | La Red de PROMECAFE / <i>Le Réseau PROMECAFE</i> | J.R. Hernandez |
| 10:30 | Las necesidades de reorientación de la investigación con miras al siglo XXI <i>Les besoins de réorientation de la recherche en vue du XXI siècle</i> | R. Guevara |
| 11:00 | Discusión/Discussion | |
| 11:30 | Clausura/Clôture | |
| 12:00 | Almuerzo/Déjeuner | |
| 13:30 | Tarde Libre / Après-Midi Libre | |

Miércoles 29 de Noviembre / Mercredi 29 novembre

Salida de los participantes/ *Départ des participants*

Visitas / Visites/ Visits

Lunes 27 de Noviembre / *Lundi 27 novembre*

13:30 - 14:30: Unidad de Biotecnología del CATIE / *Biotechnology Unit in CATIE*

En CATIE, queremos trabajar con ustedes para mejorar la agricultura y apoyar el manejo de bosques, preservando y utilizando la diversidad genética. Por esto estamos desarrollando actividades en la investigación, capacitación, enseñanza y transferencia de tecnología aplicadas a la conservación de los recursos fitogenéticos, el fitomejoramiento, la fitoprotección y el manejo de bosques. **1. Investigar y desarrollar técnicas de propagación *In Vitro*** de especies útiles para América Latina y el Caribe, enfocados a la conservación, el mejoramiento, la producción y distribución de nuevas variedades. **2. Apoyar los programas de mejoramiento genético** en cultivos tropicales (café, banano, cacao) y especies forestales (*Swietenia macrophylla*, *Cedrella odorata*) a través de técnicas del cultivo de tejidos (androgénesis, ingeniería genética), histología y de la biología molecular (electroforesis; RAPD's; RFLP). **3. Preservar en condiciones *In Vitro* el germoplasma** de gran importancia para América Latina y el Caribe, a través del cultivo de tejidos y de la crioconservación, para asegurar su existencia y facilitar su distribución. **4. Apoyar los programas de educación** a través de capacitación formal, de asesoramiento y de asistencia técnica.

El desarrollo de métodos de regeneración por cultivo de tejidos es una prioridad en la Unidad de Biotecnología del CATIE, debido a su impacto tanto en la conservación de los recursos fitogenéticos como en los sistemas agronómicos y forestales. En caso que sea para la propagación y distribución de materiales libres de patógenos o para el mejoramiento genético a través del rescate de embriones, la propagación clonal, los haplométodos, la fusión de protoplastos o la ingeniería genética, el desarrollo de un método eficaz de regeneración por cultivo de tejidos consiste en la etapa indispensable más limitante. En CATIE, el cultivo de tejidos tiene dos aplicaciones fundamentales en el mejoramiento genético: El primero consiste en apoyar los métodos convencionales de creación varietal en café (*Coffea arabica*) a través de la obtención de plantas di-haploides homocigotas utilizando el cultivo de anteras o de microesporas. El segundo trata de la creación directa de variabilidad genética utilizando la técnica del ADN recombinante o ingeniería genética. La diversidad genética de las plantas es una fuente natural limitada que provee los genes necesarios para el mejoramiento de las variedades. Desde, hace unos años, factores como la sustitución de los genotipos nativos por variedades mejoradas, la deforestación y el cambio en las técnicas culturales han llevado a una erosión profunda de los recursos genéticos. La Unidad de biotecnología cuenta actualmente con colecciones *In Vitro* a corto y mediano plazo de más de 300 accesiones de los géneros *Coffea*, *Musa*, *Dioscorea*, *Ipomoea*, *Xanthosoma*, *Colocasia*, *Manihot* y *Vainilla*. La investigación desarrollada enfoca nuevos géneros como *Sapotaceas* y nuevas especies como *Bactris gasipaes* y *Swietenia macrophylla* así como el desarrollo de nuevos métodos de conservación a largo plazo o crioconservación usando las técnicas de encapsulación-deshidratación, vitrificación y desecación para el almacenamiento de materiales a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C).

Los marcadores moleculares son marcadores genéticos a nivel molecular utilizados en la caracterización genética de las especies así como para la localización de los genes (mapeo genético). Existen dos categorías de marcadores, las proteínas y los fragmentos o copias de fragmentos de ADN. Las proteínas o enzimas se revelan mediante la electroforesis de isoenzimas mientras que los fragmentos de ADN se revelan mediante las técnicas de RFLPs (fragmentos de restricción de longitudes polimórficas) o de RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar). En CATIE, desarrollamos y aplicamos estas nuevas tecnologías tanto para la evaluación de la variabilidad genética como la construcción de mapa de ligamiento y la caracterización de los recursos genéticos.

La Biotecnología es parte de todos los programas de enseñanza, tanto a nivel de Postgrado : Maestría, como en los programas de capacitación : entrenamiento en servicio y cursos específicos regionales.

El CATIE brinda entrenamiento en servicio en las áreas del cultivo de tejidos, crioconservación, biología molecular, transformación genética e histología vegetal.

In CATIE, we want to work with you in order to both improve the agriculture and give support to forest management, preserving and using the genetic diversity. To that respect, we are developing activities in research, training, teaching and technology transfer applied to preservation of genetic resources, genetic improvement, phytoprotection and forest management. 1. Investigate and develop in vitro propagation techniques of useful species for Latin America and the Caribbean, focusing on preservation, genetic improvement, production and distribution of new varieties. 2. Supporting traditional genetic improvement in tropical crops (coffee, banana, cocoa) and forest species (Swietenia macrophylla, Cedrella odorata) through tissue culture methods (androgenesis, genetic engineering), histology and molecular biology (Electrophoresis, RAPD's, RFLP). 3. preserving in vitro the germplasm of great interest for Latin America and the Caribbean through tissue culture and cryopreservation, in order to secure their existence and promote their

distribution. **4. Supporting the Post Graduate school programs through formal training, expertise and technical assistance.**

The development of tissue culture methods to regenerate plants is a priority in the Biotechnology Unit of CATIE because of their high impact on the preservation of genetic resources of agronomical interest and of forest systems. The development of an efficient regeneration method through tissue culture is an essential step for both propagation of disease free material and genetic improvement through embryo rescue, clonal propagation, haplomehtods, protoplast fusion or genetic engineering. In CATIE, tissue culture has two fundamental applications as regards genetic improvement :The first one consists in supporting the conventional methods aimed at selecting varieties in coffee (*Coffea arabica*) through the obtention of homozygous di-haploids using anther or microspores culture. The second one is about the direct creation of genetic variability using the technique of recombinant DNA, so called genetic engineering. Plant genetic diversity is a natural limited source that provides the genes necessary for the improvement of the varieties. For several years, factors like the substitution of the native genotypes for improved varieties, deforestation and also the changes in the culture techniques have led to a strong erosion of the genetic resources. Today, the Biotechnology Unit counts with short and medium term in vitro collections of more than 300 accessions of the following species : *Coffea*, *Musa*, *Dioscorea*, *Ipomea*, *Xanthosoma*, *Colocasia*, *Manihot* and *Vanilla*. New researches focus on other families like Sapotaceae and other species like *Bactris gassipaes* and *Swietenia macrophylla* as well as on the development of new methods of long term preservation (cryopreservation) using the techniques of encapsulation-dehydration, vitrification and dessication for the storage of materials to the temperature of liquid nitrogen (-196°C).

The molecular markers are genetic markers at the molecular level used for the genetic characterization of the species as well as for the localization of the genes (genetic mapping). There are two categories of markers, the proteins and the DNA fragments (or copies of fragments). The proteins or enzymes are revealed by means of the electrophoresis of isozymes while the DNA fragments are revealed by means of other techniques : RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphism) or RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA). In CATIE, we develop and we apply these new technologies for the evaluation of the genetic variability, the construction of linkage maps and the characterization of genetic resources.

In CATIE, Biotechnology is part of all the teaching programs, especially at the Postgraduate school (Master degree), but also proposes training programs : in service training and specific regional courses.

Biotechnology at the Master level

The Biotechnology Unit and its teachers offer three courses at the MSc level. "Introduction to Biotechnology" concern all the students who want to know about the new available tools in the field of conservation of the genetic resources as well as in phytoprotection, genetic improvement and biodiversity management. "Advanced Breeding II" is designed for all the professionals who want to utilize the biotechnology methods like a series of new tools which allow new and rapid solutions to problems of alimentary security and to biodiversity management. Finally we teach a course on "Vegetal Anatomy and Physiology" directed to students of all the specialties. In this course, students get familiar with the internal structure of the plant and understand some of its physiological processes.

Biotechnology and training

CATIE offers in service trainings in the area of tissue culture, cryopreservation, molecular biology, genetic transformation and histology. Training can be focused on a methodology or on a crop depending on the work that is carried out by the trainee. CATIE gives courses in topics relating the biotechnology with the areas of genetic resources and plant breeding.

15:00 - 17:00: **Germoplasma al campo del CATIE / CATIE field germplasm**

El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) inicio el establecimiento de colecciones de germoplasma en 1942 en ese entonces IICA. A partir de 1976 se establece la Unidad de Recursos Fitogenéticos por recomendación de la Reunión de Especialistas en Recursos Fitogenéticos efectuada en Beltsville, Estados Unidos en 1972 y en CATIE (CATIE/FAO) en 1973

La Unidad de Recursos Fitogenéticos conserva en su banco de germoplasma alrededor de 350 especies de importancia actual o potencial. El área de conservación en colecciones de campo comprende una finca de 50 ha con aproximadamente 4.700 introducciones; las cuales se están caracterizando sistemáticamente para conocer su potencial agronómico como es el caso del pejíbaye (*Bactris gasipaes*), cacao (*Theobroma cacao*), Café (*Coffea arabica*), Achiote (*Bixa orellana*), etc.

Las semillas ortodoxas se conservan en cámaras frías de almacenamiento: una a corto plazo (colección activa) a 5°C y 35% H.R. y otra a largo plazo (Colección base) a -17°C. En las cámaras de almacenamiento se conservan 6279 introducciones de especies hortícolas, más un duplicado de la colección mundial de frijol (*Phaseolus sp.*) de 23427 introducciones. Las especies de mayor relevancia conservadas en las cámaras de almacenamiento son : *Capsicum sp.* (chile), *Cucurbita sp.* (calabaza), *Lycopersicon sp.* (tomate), *Phaseolus sp.* (Frijol). Para el control de viabilidad de la semilla almacenada se realizan monitoreos periódicos y para aquellas muestras que presenten bajo poder germinativo se procede de inmediato a su regeneración

A la fecha se ha caracterizado la colección de *Capsicum sp.* en un 90% y la colección de *Cucurbita sp.* en un 20%; y los trabajos continúan en forma sistemática para ofrecer a los usuarios la información que le permita seleccionar genotipos útiles para sus programas de mejoramiento genético.

The Tropical Agricultural Research and Higher Education Center (CATIE) began the establishment of germplasm collections in 1942 as it still IICA. Since 1976 a Phylogenetic Resources Unit was established by recommendation of the Phylogenetic Resources specialists meeting held at Beltsville, United States in 1972 and at CATIE (CATIE/FAO) in 1973.

*The Phylogenetic Resources Unit preserves in its germplasm about 350 species of actual or potential importance. The area for field preservation represents 50 ha with approximately 4.700 introduction; which are systematically characterized for better knowledge on its agronomic potential as for example peach palm (*Bactris gasipaes*), cocoa (*Theobroma cacao*), coffee (*Coffea arabica*), annato (*Bixa orellana*) etc.*

*Orthodox seeds are preserved in cool storage chambers: a short term (active) collection at 5°C and 35% R.H. and a long term (basic) collection at -17°C. In the storage chambers 6279 introductions of horticultural species are preserved, plus a duplicate of the world collection of beans (*Phaseolus sp.*) with 23427 introductions. The species of highest interest which are preserved in the storage chambers are: *Capsicum sp.* (sweet and hot pepper), *Cucurbita sp.* (calabaza), *Lycopersicon sp.* (tomato), *Phaseolus sp.* (beans). In order to control the viability of stored seeds, monitorings are done periodically and those showing a low germinative potential are germinated immediately.*

*At this time, 90% and 20% respectively of the *Capsicum sp.* and *Cucurbita sp.* germplasm were characterized; the characterization works are done systematically follow in order to offer the users all the information needed to select useful genotypes for their breeding program.*

| | | |
|--------------------|-----------------------|--------------------|
| RESUMENES | / RESUMES | /SCIENTIFIC |
| CIENTÍFICOS | /SCIENTIFIQUES | /ABSTRACTS |

MEJORAMIENTO GENETICO - AMELIORATION GENETIQUE

El mejoramiento de las plantas tropicales

J. Schwendiman

Representante MICAP (misión de conocimiento y mejoramiento de las plantas), CIRAD

Jefe de BIOTROP, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier, Francia.

Desde hace algunos años, la comunidad internacional se preocupa de las graves pérdidas en las ganancias del rendimiento y de la producción en la agricultura tropical. La revolución verde, por muchas razones, no pudo concretizar todas las promesas que ella abarcaba y una reforma del sistema internacional de la investigación agronómica, bajo la marca de revolución "doblamemente verde", se revela indispensable. Ella es aún más necesaria después de la reciente conferencia del Cairo la cual no mostro una tendencia verdaderamente significativa hacia una disminución del crecimiento demográfico en los países en vía de desarrollo. Las consecuencias de esta situación, a corto o largo plazo, conducen a preveer el regreso del déficit alimenticio, asociado a los productos agro-industrial tropicales.

¿Cuál estrategia se debe establecer para tratar de vencer este nuevo reto que desafía particularmente al mejorador de las plantas tropicales ?

Si miramos atrás, comprobaremos que el mejoramiento del rendimiento ha sido el objetivo constante fundamental del seleccionador para la mayoría de las plantas. El mejoramiento racional ha sido practicado apenas desde hace un siglo, sin embargo este ha sido beneficiado del trabajo producido en el transcurso de los milenarios precedentes por las generaciones sucesivas de agricultores. Ellos domesticaron las plantas útiles y permitiendo la diseminación del material vegetal y con esto el origen de una gran variabilidad adaptativa. Para la mayoría de las plantas tropicales y sobre estas bases favorables, no se puede negar que el progreso genético ha sido obtenido, con mejores rendimientos en lo que a cultivos apropiados se refiere. No importa cual sea el criterio de selección adoptado, los seleccionadores de plantas tropicales no dudan cuanto a las ventajas genéticas que puedan ser obtenidas, ya sea por el acceso de una variabilidad aún no utilizada, o por la emergencia de nuevas herramientas establecidas en el sector biotecnológico.

La toma de conciencia de la selección a menudo establecida sobre una base genética estrecha llevó a la reorganización de las actividades. Así, los programas de hibridaciones interespecíficas (algodón, café, palma de aceite africana) han sido desarrollados. Algunos se revelaron muy fructuosos (1,5 millones de hectáreas de descendencia de los híbridos trispecíficos del algodón son hoy día cultivados), otros no han podido aún obtener los resultados significativos (híbridos *arabusta* de los cafetos).

Es sobretodo la colecta, la conservación, la evaluación de los recursos genéticos, iniciados bajo el patrocinio de los organismos internacionales (IPGRI = Ex IBPGR) y la iniciativa de los organismos como el CIRAD, y en relación con otros centros de investigación internacionales que se ha interesado en constituir las colecciones de trabajo, que autorizan ahora el acceso teórico al conjunto de la diversidad genética del género. Este polimorfismo, debe aún poder ser analizado, para ser conservado en un espacio reducido y a un costo mínimo (principio de las colecciones básicas), y poder ser utilizado en los programas de selección. Actualmente, la biología molecular permite el estudio de la diversidad genética a nivel del DNA mismo.

Producir más, pero al mismo tiempo producir mejor. La calidad del producto, particularmente para los mercados destinados a la exportación, se ha vuelto también un criterio imperativo : las calidades tecnológicas de la fibra del algodón represente uno de los ejemplos más significativos. Las exigencias de los consumidores deben también tomarse en cuenta, para que el producto saliendo de las variedades seleccionadas pueda ser apreciado tanto como las variedades tradicionales (ejemplo del Tô, cocido del grano de sorgo consumido en Africa).

Reducir los costos de producción conservando al medio ambiente, es también uno de los compromisos que resultan de la toma de conciencia de la degradación del medio ambiente, la cual es debida a la utilización irracional de productos químicos caros y contaminantes. Los seleccionadores consideran que hay mucho que ganar si se substituye la lucha química por la lucha genética y la lucha biológica. Preservar el medio ambiente es igualmente participar a la conquista de los espacios deteriorados o a la extensión de los cultivos hacia las regiones marginales, por la selección de nuevas variedades adaptadas a las condiciones de cultivo limitantes. La investigación sobre la tolerancia varietal a las agresiones abióticas (sequía, salinidad) participan en ese sentido.

Confrontado a esas exigencias, el seleccionador dispone también de un conjunto de herramientas. Siendo estas la utilización de los esquemas de selección más adaptados gracias al progreso de la informática (por ejemplo la selección recurrente) y de las experimentaciones más eficaces. De la misma manera interviene el sector biotecnológico.

Dentro del reino vegetal la multiplicación vegetativa *in vitro*, nunca permitió el potencial de producción esperado, sin embargo hace posible la reproducción de los mejores genotipos seleccionados.

Cuando la técnica de cultivos de haploides están bien definidas permiten la obtención de la homocigosis buscada en un tiempo reducido. La embriogénesis somática inicialmente aplicada sobre un medio sólido, posteriormente transferida a un medio líquido o bajo inmersión temporal, ofrece las posibilidades de una multiplicación indefinida, con única desventaja la toma en cuenta de las pruebas de conformidad del material genético.

Los progresos de la biología molecular, ya citados dentro del marco del conocimiento de la diversidad genética de las plantas, pueden también ser aplicados en el campo de la parasitología (virus, hongos, bacterias). Los medios de detección los más precoces y eficaces, representan una ayuda al diagnóstico del seleccionador. Alcanzar un conocimiento profundo sobre las relaciones hospedero-parásito, significa poder entender los mecanismos del ataque parasitario y las reacciones de defensa de las plantas, este conducirá a los medios de lucha aún insospechables, donde la participación del seleccionador sera por supuesto necesaria.

El marcaje molecular del genoma, esencialmente desarrollado sobre las plantas de climas templados o en la planta modelo *Arabidopsis*, se extiende hoy día al estudio de las especies tropicales. Los seleccionadores del mundo tropical han entendido rápidamente todas las ventajas que pueden esperar de los mapas genéticos, ya sea que se trate del marcaje de genes útiles, de la identificación de QTL (Quantitative trait loci) o de la selección asistida por los marcadores integrados dentro de los programas de mejoramiento (ejemplo : la transferencia de un gen de *Bacillus thuringiensis* entre 2 descendencias de maíz de clima templado). Nuevos campos de aplicación son disponibles : la cartografía comparada del genoma de especies de climas templados y la utilización de sondas heterólogas beneficia estos estudios en las especies tropicales (ejemplo : del maíz, del sorgo y de la caña de azúcar), mientras que el arroz por la reducida talla de su genoma y de su importancia económica para los PVD, es hoy día una planta modelo por el estudio de las gramíneas.

La transformación genética es una nueva herramienta que supera todas las barreras ligadas a la sexualidad. Todos conocemos el ejemplo del tomate Flavr-savr de Calgene, pero en el año de 1996,

variedades transgénicas de algodones portador de genes procedentes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* serán propuestos a los agricultores norteamericanos. En ese dominio subsisten todavía muchas incógnitas : los riesgos de diseminación hacia las especies emparentadas son todavía mal evaluados, los fenómenos de contornamiento por la aparición de los insectos resistentes falta de comprobación necesario, el conocimiento de esos nuevos productos no es muy claro. Pero la presión parasitaria que se acentúa y la ausencia de genes de resistencia dentro de la variabilidad disponible en las especies vegetales necesitan de la ingeniería genética para liberar soluciones aceptables.

Dentro de esta problemática, el seleccionador está cada vez más confrontado a la utilización de disciplinas complementarias : el mejoramiento de las plantas, la protección de los cultivos, la biometría, la tecnología, la fisiología y la agronomía.

En lo que respecta a este simposio, un enfoque multidisciplinario seguirá a lo largo de los diferentes informes que se va a presentar.

Bibliografía sumario

Plantes d'hier, d'aujourd'hui et de demain. Dossier de la Mission Connaissance et amélioration des plantes, n° 22 de la série Notes et Documents du CIRAD, 1995.

Culture *in vitro* des plantes tropicales, C. Teisson (ed.), collection Repères du CIRAD.

M. Delseny et J.C. Glaszmann. Les graminées à la carte. Biofutur, juin 1995, 52-56.

C. Lanaud et C. Nouaille. Un bel avenir pour les plantes tropicales. Biofutur, juin 1995, 57-62.

J. Schwendiman, H.G. Diem and P.C. Lefèvre. Cirad and biotechnology. Ag Biotech News and Information, vol. 6, n° 11, 1994, 269N-272-N.

L'amélioration des plantes tropicales

J. Schwendiman

Representante MICAP (misión de conocimiento y mejoramiento de las plantas), CIRAD
Jefe de BIOTROP, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier, Francia.

Depuis déjà quelques années, la communauté internationale s'inquiète du grave fléchissement des gains de rendement et de production en agriculture tropicale. La révolution verte, pour de multiples raisons, n'a pu concrétiser tous les espoirs qu'elle portait et une réforme du système international de la recherche agronomique, sous le label de révolution doublement verte, s'avère indispensable. Elle est d'autant plus nécessaire que la récente conférence du Caire n'a pas fait apparaître de tendance vraiment significative vers une baisse de la croissance démographique dans les pays en voie de développement. Les conséquences de cette situation, sur le court et le moyen terme, amènent à prévoir un retour du déficit alimentaire, allié à celui des produits agro-industriels tropicaux.

Quelle stratégie faut-il développer pour tenter de relever ce nouveau défi lancé notamment à l'améliorateur des plantes tropicales ?

Si l'on opère un retour en arrière, on constate que l'amélioration du rendement a été de façon constante pour la majorité des plantes l'objectif prioritaire du sélectionneur. L'amélioration rationnelle n'est pratiquée que depuis un siècle environ, mais elle a bénéficié du travail considérable opéré au cours des millénaires précédents par des générations successives d'agriculteurs, domestiquant les plantes utiles et procédant à une large dissémination du matériel végétal, à l'origine d'une grande variabilité adaptative. Pour la majorité des plantes tropicales et sur ces bases favorables, il est indéniable que des progrès gains génétiques sont encore possibles, soit par l'accès à une variabilité restée encore inutilisée, soit par l'émergence de nouveaux outils fondés notamment sur les biotechnologies.

La prise de conscience d'une sélection souvent fondée sur une base génétique trop étroite a conduit à des réorientations d'activités. Ainsi, des programmes d'hybridations interspécifiques (cotonnier, caféier, palmier à huile) ont été développés. Certains se sont avérés très fructueux (1,5 millions d'hectares de descendances d'hybrides trispécifiques de cotonniers sont aujourd'hui cultivés), d'autres n'ont pas encore permis d'obtenir des résultats significatifs (hybrides *arabusta* de caféiers). Mais c'est surtout la collecte, la conservation, l'évaluation des ressources génétiques, initiées sous l'égide d'organismes internationaux (IPGRI = ex IBPGR) ou à l'initiative d'organismes comme le CIRAD visant, en relation avec des centres de recherche nationaux, à constituer des collections de travail, qui autorisent désormais l'accès théorique à l'ensemble de la diversité génétique du genre. Ce polymorphisme, encore faut-il être en mesure de l'analyser, soit pour le conserver dans le minimum d'espace et au moindre coût (principe des "core collections"), soit pour l'utiliser dans les programmes de sélection. La biologie moléculaire permet désormais d'appréhender cette diversité au niveau de l'ADN lui-même.

Produire plus, mais aussi produire mieux. La qualité du produit, notamment pour des marchés destinés à l'exportation, est aussi devenue un critère impératif: les qualités technologiques de la fibre du cotonnier sont parmi l'un des exemples les plus significatifs. Les exigences des consommateurs doivent aussi entrer en ligne de compte, pour que le produit issu des variétés sélectionnées demeure aussi apprécié que celui des variétés dites traditionnelles (ex du tô, bouillie du grain de sorgho consommée en Afrique).

Réduire les coûts de production dans le respect de l'environnement, c'est aussi l'une des contraintes qui émergent avec la prise de conscience de la dégradation de l'environnement due à l'utilisation souvent abusive de produits chimiques coûteux et polluants. L'ensemble des sélectionneurs considère qu'il y a beaucoup à gagner en substituant la lutte génétique et la lutte biologique à la lutte chimique. Préserver l'environnement c'est également participer à la reconquête d'espaces dégradés ou à l'extension des cultures vers des zones

marginales, par la sélection de nouvelles variétés adaptées à des conditions plus contraignantes de culture. Les recherches sur les tolérances variétales aux agressions abiotiques (sécheresse, salinité) participent à cette démarche.

Confronté à cet ensemble de contraintes, le sélectionneur dispose aussi désormais d'une panoplie d'outils. Liée aux progrès de l'informatique, c'est l'utilisation de schémas de sélection mieux adaptés (sélection récurrente par exemple) et de plans d'expérimentations plus efficaces. C'est aussi l'intervention de l'ensemble que représentent les biotechnologies.

Dans le domaine végétal, la multiplication végétative *in vitro*, outre des gains de productivité jamais atteints, autorise la reproduction des meilleurs génotypes sélectionnés. Les haplométhodes, lorsqu'elles sont maîtrisées, permettent de se dispenser du long processus de générations successives conduisant à l'homozygotie recherchée. L'embryogenèse somatique d'abord conduite sur milieu solide, puis désormais en milieu liquide ou en immersion temporaire, offre des possibilités de multiplication infinies, avec actuellement comme seule réserve les indispensables tests de conformité à conduire.

Les progrès de la biologie moléculaire, déjà évoqués dans le cadre de la connaissance de la diversité génétique des plantes, s'appliquent aussi à celle des parasites (virus, champignons, bactéries). Les moyens de détection plus précoces et plus efficaces, et donc une aide au diagnostic pour le sélectionneur, vont se multiplier. Connaître au niveau le plus fin les relations hôte-parasite, c'est-à-dire arriver à "décortiquer" les mécanismes de l'agression parasitaire et les réactions de défense des plantes, débouchera sur des moyens de lutte encore largement insoupçonnés, mais où la participation du sélectionneur sera certainement requise.

Le marquage moléculaire du génome, essentiellement développé sur les plantes tempérées ou sur le modèle végétal *A rabidopsis*, s'étend désormais aux espèces tropicales. Les sélectionneurs du monde tropical ont rapidement compris tout le parti qu'ils pouvaient attendre de ces cartes génétiques, qu'il s'agisse du repérage de gènes utiles, de l'identification de QTL (Quantitative Trait Loci) ou de la sélection assistée par marqueurs qu'il conviendra d'intégrer dans les programmes d'amélioration (ex. du transfert d'un gène de *Bacillus thuringiensis* entre 2 lignées de maïs tempéré). De nouveaux champs d'application sont ouverts: la cartographie comparée des génomes fait bénéficier nombre d'espèces tropicales des sondes hétérologues obtenues sur espèces tempérées (ex du maïs, du sorgho et de la canne à sucre), tandis que le riz de par la taille réduite de son génome et son importance économique pour les PVD apparaît désormais comme une plante pivot pour l'étude de l'ensemble des Graminées.

La transformation génétique est un nouvel outil qui transgresse toutes les barrières liées à la sexualité. Chacun connaît l'exemple de la tomate Flavr-Savr de Calgene, mais dès 1996 des variétés transgéniques de cotonniers porteuses de gènes en provenance de la bactérie *Bacillus thuringiensis* seront proposées aux agriculteurs nord-américains. Dans ce domaine subsistent encore de nombreuses inconnues: les risques de dissémination vers les espèces apparentées sont encore mal évalués, les phénomènes de contournement par l'apparition d'insectes résistants manquent du recul nécessaire, la perception du grand public vis-à-vis de ces nouveaux produits n'est pas encore connue. Mais la pression parasitaire qui s'accroît et l'absence de gènes de résistance au sein de la variabilité disponible dans l'espèce végétale demandent le recours au génie génétique pour dégager des solutions acceptables.

Dans cet ensemble complexe, le sélectionneur est de plus en plus à la charnière de plusieurs disciplines complémentaires: l'amélioration des plantes, la défense des cultures, la biométrie, la technologie, la physiologie, l'agronomie. Pour ce qui nous préoccupe durant ce Symposium, c'est bien cette approche multidisciplinaire qui apparaîtra lors des exposés qui vont suivre.

Bibliographie sommaire

Plantes d'hier, d'aujourd'hui et de demain. Dossier de la Mission Connaissance et amélioration des Plantes, n° 22 de la série Notes et Documents du CIRAD, 1995.

Culture *in vitro* des plantes tropicales, C. Teisson (ed.), collection Repères du CIRAD. M. Delseny et J.C. Glaszmann. Les graminées à la carte. Biofutur, juin 1995, 52-56.

C. Lanaud et C. Nouaille. Un bel avenir pour les plantes tropicales. Biofutur, juin 1995, 5762.

J. Schwendiman, H.G. Diem and P.C. Lefèvre. Cirad and biotechnology. AgBiotech News and Information, vol. 6, n° 11, 1994, 269N-272N.

I. LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES - LES OUTILS MOLECULAIRES

Mapping the Banana Genome

P.J.L. Lagoda
CIRAD-BIOTROP lab. AGETROP, Montpellier, France

Modern crop improvement is based on molecular marker assisted selection and introgression of agronomic traits of interest such as pest resistance or quality. Many crops are being investigated on the molecular level using improved marker systems. Tropical crops such as *Musa* are seldom, if ever, included in international genome analysis initiatives, but these crops are of paramount importance to the world for socio-economical and ecological reasons.

Musaceae are among the tallest monocotyledons and belong to the major basic food-producing plants on earth. In fact, one of the ten most important crops in the world are dessert and cooking bananas (FAO). Dessert bananas are intensively cultivated for export to Europe and North America, while cooking bananas and some dessert bananas are cultivated most often in backyard gardens for local consumption in tropical countries.

The first partial linkage map of the banana genome using molecular markers has just been published. It is the result of a highly collaborative work between numerous scientists and research assistants of different CIRAD departments (France, Montpellier, FLHOR department: H. TEZENAS-DU-MONTCEL, D. DAMBIER; GERDAT department, AGETROP laboratory: C. LANAUD, P.J.L. LAGODA, F. CARREEL, F.-C. BAURENS, J.-L. NOYER; D. GONZALEZ-DE-LEON, actually at CIMMYT, Mexico; S. FAURE, actually at GENETHON, Paris, France), outstations overseas (FLHOR outstation Guadeloupe: F. BAKRY, J.-P. HORRY, actually INIBAP), the CRBP in Cameroun (E. FOURE, C. JENNY, E. AUBOIRON) and INIBAP.

The present map is based on 82 individuals from an F2 type progeny (SF265 [AAcv] X *M.a. banksii* Banksii [AAs]), linking 90 loci (58 RFLP loci, 4 isoenzyme loci and 28 RAPD loci). 77 loci are associated in 15 linkage groups and 13 loci are segregating independently. In addition, a self-fertilised progeny, 89 individuals, from a highly fertile synthetic AA diploid (M53), displaying a BLSD resistant phenotype, is being mapped.

Although mapping the banana genome is complex due to sub-species specific translocations, comparative map analysis uncovers interesting data on genome structure (i.e. identification of translocation breakpoints) as well as on the molecular markers used. Depending on the population mapped, the same RAPD markers associate in different linkage groups whereas RFLP markers conserve colinearity. That's why exclusive use of RAPD markers for QTL mapping in bananas is risky and QTL analyses should be based on co-dominant markers. This study can be performed by RFLP, but recently developed microsatellite markers on banana proved to be more powerful yet (high abundance and polymorphism). Microsatellites may be the "anchor markers" of choice for a banana core map.

The polymorphic repeat region of microsatellite loci can easily be amplified by PCR using locus-specific flanking primers. Microsatellites are ubiquitously interspersed in eukaryotic genomes. Microsatellite polymorphism is based on a large number of alleles per microsatellite locus, which is due to a high frequency of variation in the number of repeats in different individuals or accessions.

The high level of polymorphism, combined with a high interspersion rate, makes them an abundant source of genetic markers and extensive genetic maps have been constructed on this basis for various species of the

animal and plant kingdom ranging from mouse to man and from beans to bananas. The results from these studies indicate that microsatellites in plants can be up to tenfold more variable than other marker systems such as RFLP. Microsatellites, therefore, represent a very useful genetic marker system for the genetic mapping of species with little intraspecific polymorphism. PCR-amplified microsatellite loci may provide a good alternative marker system, complementary to RFLP.

The usefulness of microsatellite derived markers is emphasised by the implication of relatively simplified laboratory techniques (PCR, non radioactive detection, no hybridisation, small genomic DNA quantity and only poor DNA quality needed, possible automation, possible transferability overseas "in situ") compared to RFLP markers. Nevertheless, development of microsatellite markers is currently limited in plants in general by the number of available published sequence data for most species. This is particularly the case for tropical crops such as banana, but an increasing number of research groups work on the molecular characterisation of these crops and there is no doubt that more DNA sequences will be available in the near future. Thus all the advantages of PCR can be taped for the genetic analysis of *Musa*.

Identification and large-scale isolation of microsatellites is best performed with a genomic library of small inserts. A partial, size fractionated, *Pst* I genomic library for *Musa*, previously established as a source for RFLP makers, has been re-screened with the synthetic poly(TA_nAT_n), poly(GC_nCG_n), poly(GA_nCT_n) and poly(GT_nCA_n) sequences for dinucleotide repeats according to standard colony lift/hybridisation procedures. After hybridisation, purified single positive colonies were amplified to extract plasmid DNA. The purified plasmids were sequenced according to standard procedures. Specific flanking primer pairs for PCR amplification were synthesised based on the sequence data from these clones. Thus microsatellite loci could be amplified using total genomic DNA and standard PCR protocols.

Roughly one sixth (17%) of the clones of the banana library contain at least one microsatellite site, as confirmed by sequencing. Surprisingly, the majority of dinucleotide repeats found are of the (GA)_n sequence family, the number of alleles per locus varying between 5 and 24 in a testing panel of 20 accessions representing the different sections of the *Musaceae* family. All the microsatellites detected in banana up to date are conserved in all these sections.

Our preliminary results show the efficiency of polymorphic microsatellite markers for mapping the banana genome with rapid and simple methods. Due to stream-lined and simplified laboratory protocols, interesting perspectives for clonal identification and marker assisted selection "in situ" (i.e. developing countries) are being opened up (e.g. PCR essay kits containing robust, extensively tested, microsatellite marker primer pairs).

| VNDR probe | % of positive clones (total = 132) | SSR consensus | n ₁ | n ₂ |
|-------------------|------------------------------------|---|----------------|----------------|
| (TC) _n | 54 | (AG) _n | 8 | 20 |
| (AC) _n | 25 | (TG) _n | 10 | 21 |
| (AT) _n | 14 | (A) _n | 14 | 17 |
| | | (TTA) _n | 6 | 16 |
| | | (TA) _n TT(TTAATA) _n | - | - |
| (GC) _n | 7 | (C) _n TT(C) _n | - | - |

| library | recombinant clones | average insert size (kb) | positive clones | % |
|--------------|--------------------|--------------------------|-----------------|----|
| <i>Pst</i> I | 765 | 2.7 | 132 | 17 |

size fractionated *Pst* I library, screened by VNDR probes, compound VNTR and microsatellite abundance (*) one clone sequenced

Cartographier le Génome des Bananiers

P.J.L. Lagoda
CIRAD-BIOTROP lab. AGETROP, Montpellier, France

Les méthodes modernes d'amélioration des plantes sont de plus en plus axées sur la sélection et l'introgession de caractères (p. ex.: résistances aux maladies, qualité) assistées par marqueurs moléculaires. De plus en plus de plantes vivrières sont étudiées au niveau moléculaire par des marqueurs de plus en plus puissants. Les plantes tropicales cependant, tels les bananiers et plantains, profitent peu, sinon pas du tout, des initiatives internationales d'analyse des génomes. Or ces plantes sont socio-économiquement et écologiquement d'une importance capitale pour le monde.

Les membres de la famille des *Musaceae* sont les plus grandes monocotylédones connues. Les bananiers et plantains sont répertoriés parmi les 10 plantes vivrières les plus importantes au monde (FAO). Les bananes dessert sont intensivement cultivées dans la zone intertropicale pour l'exportation vers l'Europe et l'Amérique du Nord. Les bananes à cuire, et quelques bananes dessert, sont localement cultivées pour l'autoconsommation par de petits et moyens producteurs dans les pays tropicaux.

La première carte génétique partielle du bananier, fondée sur des marqueurs moléculaires, vient d'être publiée. C'est le résultat d'une collaboration entre nombre de chercheurs et agents de différents départements du CIRAD métropolitain (Montpellier, département FLHOR: H. TEZENAS-DU-MONTCEL, D. DAMBIER; département GERDAT laboratoire AGETROP: C. LANAUD, P.J.L. LAGODA, F. CARREEL, F.-C. BAURENS, J.-L. NOYER; D. GONZALEZ-DE-LEON, actuellement au CIMMYT, Mexique; S. FAURE, actuellement au GENETHON, Paris), du CIRAD outremer (station FLHOR en Guadeloupe: F. BAKRY, J.-P. HORRY, actuellement INIBAP, Montpellier), le CRBP au Cameroun (E. FOURE, C. JENNY, E. AUBOIRON) et l'INIBAP.

La carte actuelle est basée sur 82 individus d'une descendance F2 (SF265 [AAcv] X *M.a. banksii* Banksii [AAs]). Elle lie 90 locus (58 RFLP, 4 isoenzymes et 28 RAPD). 77 locus sont associés dans 15 groupes de liaison et 13 locus ségrègent d'une façon indépendante. Une deuxième descendance autofécondée (89 individus) d'un hybride synthétique diploïde AA très fertile (M53), d'un phénotype résistant vis-à-vis de la Maladie des Raies Noires (MRN), est en cours de cartographie.

Bien que cartographier le génome du bananier soit rendu ardu par des translocations spécifiques de sous-espèces, la cartographie comparée révèle des données intéressantes sur la structure des génomes (c.-à-d. points de translocation), mais aussi sur les marqueurs moléculaires utilisés. En fonction de la population cartographiée, les mêmes marqueurs RAPD, s'associent dans des groupes de liaison différents, par contre, les marqueurs RFLP gardent leur colinéarité. Voilà pourquoi l'utilisation exclusive de marqueurs RAPD pour la cartographie de caractères quantitatifs semble mal indiquée. L'analyse des caractères quantitatifs devrait exclusivement se baser sur des marqueurs co-dominants. Cette étude peut être soutenue par les marqueurs RFLP, mais pour le bananier, nous avons récemment testé des marqueurs plus polymorphes et plus abondants: les microsatellites.

La région d'ADN répétée polymorphe des locus microsatellite est assez petite pour être amplifiée par PCR. Il suffit de définir des amorces spécifiques du locus dans les régions uniques flanquant la région variable. En général les locus microsatellites sont uniformément distribués dans les génomes étudiés, et présents en très grand nombre.

Sous ces perspectives, les marqueurs microsatellites semblent pouvoir devenir les "marqueurs d'ancrage" de choix pour une carte "consensus" ou intégrative (core map) du bananier. De plus, il semble plus facile de développer ces marqueurs microsatellites pour l'exportation car il est envisageable de produire des

systèmes intégrés robustes marqueurs/système de détection sous forme de kits PCR non-radioactifs ne demandant qu'un minimum d'infrastructure pour être opérationnels "sur le terrain" (laboratoire portable). Leur distribution et le taux élevé de leur polymorphisme ont fait des microsatellites une source abondante de marqueurs génétiques pour des projets de cartographie de pointe concernant un grand nombre d'espèces des règnes animal et végétal, de la souris à l'homme et du petit pois à la banane. Les résultats de ces études indiquent que les microsatellites peuvent être dix fois plus variables que d'autres systèmes de marqueurs, comme les RFLP. Ils seraient donc les marqueurs de choix pour la cartographie d'espèces à faible taux de polymorphisme intra-spécifique. Les marqueurs microsatellites, détectés par PCR, se présentent ainsi comme un système de marqueurs co-dominants alternatif, complémentaire aux RFLP.

L'utilité des marqueurs microsatellites est accentuée par les procédures relativement simplifiées (PCR, détection non-radioactive sans hybridation, faible quantité et qualité d'ADN génomique nécessaires et suffisantes, automatisable, transférabilité) par rapport aux RFLP. Par contre le développement des marqueurs microsatellites est pour le moment limité par le faible nombre de données de séquences publiées pour la plupart des espèces végétales. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces tropicales, comme la banane. Cependant le nombre de groupes de recherche travaillant à la caractérisation moléculaire de ces espèces est croissant et il n'y a pas de doute que ces données seront accessibles à moyen, voire à court terme. Tous les avantages des marqueurs microsatellites sont désormais à la disposition de l'analyse génétique des *Musa*.

Identifier et isoler des locus microsatellites s'effectuent le mieux à l'aide d'une banque génomique à inserts courts. Une banque génomique partielle *Pst* 1 de *Musa*, établie comme source de marqueurs RFLP a été re-criblée avec des sondes synthétiques poly(TA_AT), poly(GC_CG), poly(GA_CT) et poly(GT_CA) selon des procédures standardisées. Après identification par hybridation, les colonies positives purifiées ont été amplifiées pour extraire l'ADN des plasmides, afin de séquencer les inserts. A l'aide de l'information de séquence, des régions microsatellites ont été identifiées et des amorces PCR spécifiques des régions flanquantes synthétisées. Ainsi ces locus microsatellites peuvent être amplifiés, et des allèles identifiés, à partir d'ADN génomique total, en utilisant des protocoles PCR standardis. Un sixième (17%) des clones de la banque génomique bananier comportent au moins un site microsatellite. La majorité des locus appartiennent à la famille des répétitions (GA)_n, ce qui a été surprenant. Le nombre d'allèles par locus varie entre 5 et 24 dans une population de 20 accessions, représentant les différentes sections de la famille des *Musaceae*. Les locus sont conservés dans les sections apparentées.

Nos résultats préliminaires permettent de juger de l'efficacité de l'application des marqueurs microsatellites à la cartographie du génome des bananiers par des méthodes rapides et simplifiées et ouvrent des perspectives sur leur utilisation pour l'identification clonale.

| sonde VNDR | % clones positifs (total = 132) | microsatellite | R_{AG} | R_{AT} |
|--------------------|---------------------------------|---|----------|----------|
| (TC) _n | 54 | (AG) _n | 8 | 20 |
| (AC) _n | 25 | (TG) _n | 10 | 21 |
| (AT) ₁₅ | 14 | (A) _n | 14 | 17 |
| | | (TTA) _n | 6 | 16 |
| | | (TA) _n TT(TTAATA) _n | - | - |
| (GC) _n | 7 | (C) _n TT(C) _n (*) | - | - |

| banque | inserts | taille moyenne (kb) | clones positifs | % |
|--------------|---------|---------------------|-----------------|----|
| <i>Pst</i> 1 | 765 | 2.7 | 132 | 17 |

banque *Pst* 1 partielle, criblée par sondes VNDR, abondance des locus VNTR simples et complexes

(*) un clone séquencé

Estudio molecular de los recursos genéticos de café: resultados preliminares y trabajos en curso

François Anthony : ORSTOM/CATIE, Unidad de Biotecnología, Ap. 59, 7170 Turrialba (Costa Rica)

Benoît Bertrand : CIRAD CP/PROMECAFE, IICA, Ap. 55, 2200 Coronado, San José (Costa Rica)

Un programa regional de mejoramiento genético del café Arabica está desarrollandose a través del IICA/PROMECAFE, CATIE y Cooperación Francesa, para enriquecer la base genética de las variedades cultivadas en América Central. Se fundamenta en la utilización de los recursos genéticos para introducir nuevas potencialidades en el material cultivado. Sin embargo un uso racional de estos recursos requiere datos sobre la organización de la información genética al nivel molecular.

Esta comunicación presenta los estudios realizados por varios equipos sobre los recursos genéticos de café, con las herramientas de la Biología Molecular. Los resultados se refieren a la estructura de la diversidad genética entre y intra-especies del género *Coffea*, a las relaciones filogenéticas entre especies y a la construcción de un mapeo genético. Se discuten las técnicas utilizadas bajo una visión crítica a fin de poder apoyar al programa regional de mejoramiento genético a corto y mediano plazo.

Etude moléculaire des ressources génétiques du caféier: resultats préliminaires et travaux en cours

François Anthony : ORSTOM/CATIE, Unidad de Biotecnología, Ap. 59, 7170 Turrialba (Costa Rica)

Benoît Bertrand : CIRAD CP/PROMECAFE, IICA, Ap. 55, 2200 Coronado, San José (Costa Rica)

Un programme d'amélioration génétique du caféier Arabica est développé par l'IICA/PROMECAFE, le CATIE et la Coopération Française pour enrichir la base génétique des variétés cultivées en Amérique centrale. Ce programme repose sur l'utilisation des ressources génétiques pour introduire de nouvelles potentialités chez le matériel cultivé. Cependant, une utilisation rationnelle de ces ressources requière des données sur l'organisation de l'information génétique au niveau moléculaire.

Cette communication présente les études réalisées par plusieurs équipes sur les ressources génétiques caféières avec les outils de la Biologie Moléculaire. Les résultats concernent la structure de la diversité génétique inter et intra-spécifique dans le genre *Coffea*, les relations phylogénétiques entre espèces et la construction d'une carte génétique. Les techniques utilisées y sont discutées avec une vision critique afin de pouvoir appuyer le programme régional d'amélioration à court et moyen termes. .

Cacao y Marcadores de ADN en el CATIE

W. Phillips, P. Fritz

CATIE, Turrialba, Costa Rica

Los marcadores moleculares han sido utilizados en cacao en investigaciones muy diversas, relacionadas sobre todo con la caracterización de clones, la determinación del nivel de variabilidad del género, en estudios filogenéticos y para la construcción de mapas genéticos de ligamiento. Los marcadores más usados han sido las isoenzimas y los marcadores de ADN denominados RFLP y RAPD.

En el CATIE las investigaciones al respecto se iniciaron en 1987, utilizando inicialmente RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic DNA). Debido a su menor complejidad, menor costo y mayor rapidez, pronto se adoptó el análisis RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) como metodología de trabajo, aunque en coordinación con el laboratorio Francereco (Tours, Francia) se continuaron haciendo investigaciones con RFLP.

El trabajo en CATIE ha sido posible debido a la existencia de dos poblaciones segregantes de cacao, que han servido de base para la mayoría de los estudios con marcadores moleculares. La primera población se conoce como "Experimento Central de La Montaña", el cual fue establecido en 1977 y corresponde a una población F1 de 120 árboles del cruce entre los clones Catongo y Pound-12. Su objetivo original era evaluar el efecto sobre la producción de cacao, de dos especies arbóreas de sombra: *Cordia alliodora* y *Erythrina poeppigiana*. Este experimento ha sido también objeto de extensivos estudios agronómicos y agroforestales. La segunda población segregante, denominada "Catongo x (Catongo x Pound-12)", fue sembrada en 1990 y corresponde a 191 árboles del retrocruce entre el Catongo y el árbol #33 del Experimento Central.

Las principales aplicaciones en el CATIE de los marcadores de ADN en cacao, ha sido la verificación de cultivares, la construcción de dos mapas de ligamiento genético y el mapeo de los QTL.

VERIFICACION DE CULTIVARES

Por mucho tiempo se creyó que los 120 árboles del Experimento Central pertenecían al cruce "Catongo x Pound-12", pero los análisis RFLP demostraron recientemente, que solo 55 de ellos son híbridos verdaderos. De los restantes árboles, 29 corresponden a autopolinizaciones del Pound-12, tres a autopolinizaciones del Catongo y el remanente no tiene origen conocido. Esto sugiere un error al establecer el experimento. Los resultados también generan preguntas con respecto a la compatibilidad del Pound-12, el cual siempre había sido considerado como autoincompatible, o sea, incapaz de producir autopolinizaciones. Usando la misma metodología se encontró que cinco árboles del retrocruce tampoco correspondían al material original, lo cual evidencia lo frecuente que se da este problema en cacao, a pesar de seguirse las recomendaciones para lograr polinizaciones controladas.

MAPA DE LIGAMIENTO GENETICO

Un mapa de ligamiento genético es una representación gráfica que muestra las posiciones relativas de los genes y/o marcadores en los grupos de ligamiento (cromosomas).

Para la construcción del mapa genético del retrocruce "Catongo x (Catongo x Pound-12)", se aisló el ADN de los clones Catongo y Pound-12 a partir de hojas, luego se aisló el ADN del árbol F1 que sirvió como padre (Arbol 33), y finalmente el ADN de 137 árboles del retrocruce. Utilizando la metodología RAPD, se buscaron polimorfismos entre el Catongo, el Pound-12 y el Arbol 33. Para esto se evaluaron 1.200 "primers", que consistían en secuencias al azar de 10 pares de bases. Solamente se seleccionaron los "primers" que producían bandas amplificadas en el Pound-12 y en el Arbol 33, pero no en el Catongo. Al identificar este tipo de "primers" (cada uno representando loci separados), se concluía que el Arbol 33 debía ser heterocigoto y el cruce con el homocigoto recesivo Catongo daría una segregación 1:1. Esta situación se encontró únicamente en 100 de los 1.200 "primers" evaluados. Cuando la colección de datos fue evaluada usando el programa estadístico llamado MAPMAKER (Lander *et al.* 1987), el cual está diseñado para el análisis del ligamiento genético, se identificaron 10 grupos de ligamiento que corresponden al número

haploide de cromosomas del cacao. En adición a los 81 marcadores RAPD encontrados, el mapa incluye 12 marcadores RFLP y dos marcadores fenotípicos, que corresponden aparentemente, a dos genes simples, uno de ellos relacionado con la producción de antocianinas y el otro con la autoincompatibilidad, ambos ubicados en el cromosoma 4. La distancia total del mapa es de 887 centimorgans, con una distancia promedio entre los loci de 10,5 cM

También se obtuvo un mapa de ligamiento para la población Catongo x Pound-12, con lo cual se pueden iniciar estudios comparativos entre los dos mapas que podrían revelar la fidelidad con que la información genética se transfiere de una generación a otra. En este momento se han identificado 15 marcadores que están presentes en ambos mapas y se ha hecho una integración preliminar de los mismos.

MAPEO DE LOS QTL

La determinación de los QTL o locus relacionados con características cuantitativas es útil en el mejoramiento genético de las plantas, porque ellos pueden servir como marcadores para la selección de plantas en estados tempranos de desarrollo (semillas, plántulas, etc.) y porque actualmente es posible no solo encontrar el locus que está ligado con una característica, sino que también identificar el gen asociado con ese locus.

ra cada árbol del retrocruce se obtuvo dos tipos de información: datos fenotípicos y datos generados con los marcadores de ADN. Ya que los datos de los marcadores fueron integrados dentro de un mapa de ligamiento genético, las comparaciones entre los patrones de herencia de estos marcadores con los datos fenotípicos, permitieron detectar áreas en el cromosoma que están relacionadas con las características. Las comparaciones entre los datos fenotípicos y los marcadores de ADN, fueron establecidas mediante análisis de varianza y pruebas de T no pareada del paquete estadístico Statview. Así por ejemplo, ha sido posible identificar en forma preliminar tres loci que están relacionados con la resistencia a *Phytophthora palmivora*.

II. LOS PROGRAMAS DE SELECCION - LES PROGRAMMES DE SELECTION

Genetic improvement of bananas

F. Bakry & C. Jenny

CIRAD-FLHOR, Station de Neufchâteau, Sainte Marie, 97130 Capesterre Belle Eau, Guadeloupe, FWI.

Black Leaf Streak Disease and Panama Disease are certainly the most important diseases affecting banana. Guadeloupe and Martinique are still BLSD free, but its only a temporary situation as it has already been recorded northward in Cuba and southward in Venezuela .

Faced with these problems, CIRAD-FLHOR started since 1983 a genetic improvement program for export and local consumption bananas, with the help of the EEC-STD program. This program is being developed in collaboration with CIRAD in Montpellier (FLHOR & BIOTROP/AGETROP), the universities of Orsay (Paris), Leuven and Gembloux (Belgium), CATIE (Costa-Rica) and CRBP (Cameroon). This genetic improvement program wishes to identify, create and then promote new varieties, more tolerant or even resistant to these pests and diseases, by developing two main research axis :

- 1- the improvement of cooking bananas for local markets and small farming systems, where no fertilizer nor pesticide is used in traditionnal culture,
- 2- and the selection of dessert type bananas for export and local consumption.

In Guadeloupe, the genetic improvement program of bananas is based on the improvement of diploid clones, basis of the synthesis of successfull triploid varieties. This scheme is composed of four successive steps :

- 1- the obtention of pure lines (homozygous plants), diploid and fertile.
- 2 - the creation of elite F1 hybrids (heterozygous) by crossing these pure lines. These F1 hybrids may have a monospecific origin (*Musa acuminata*) or an interspecific origin (*M. acuminata* / *M. balbisiana*) as it is the case for natural varieties.
- 3 - doubling the number of chromosomes of these F1 hybrids using a colchicine treatment, in order to obtain tetraploid plants ($4X = 2 \text{ times } 2X$)
- 4- and finally, the synthesis of triploid hybrids ($3x$), crossing a tetraploid plant ($4X$ - step 3) with an other diploid pure line.

GENETIC RESOURCES

In Neufchâteau, most of the work dealing with Genetic Resources consists in collecting and storing clones in our living collection, in order to identify and evaluate their potential for varietal creation and selection.

The Neufchâteau collection holds today nearly 400 accessions. In 1994, 12 new accessions from Cuba and 29 from Papua New-Guinea prospections have been added. In these last ones, some are diploid AA cooking cultivars which must be considered as ancestral forms of the present triploid cooking bananas. Those which reveal to be resistant to BLSD (evaluation done at CRBP - Cameroon) will be used for hybridization as soon as possible.

VARIETAL CREATION

Searching for pure lines : androgenesis in bananas.

See the communication upon androgenesis by Kerbellec and Bakry in this same reunion.

Creation of F1 hybrids

In 1994, we mainly concentrate on the creation of interspecific AB hybrids, according to the scheme described here :

BB (wild - female) x AA (cultivar - male) -> AB (cultivar)

There is a lot of variability in these hybrids, but they all reveal a very low pollen fertility rate. Among 135 interspecific diploid hybrids in the field, only 10 were kept in 1994. These are parthenocarpic plants, which heritated good robustness and anchoring from their balbisiana parent.

These plants are now getting through in vitro culture so as to be colchicine treated in order to obtain allotetraploid AABB hybrids, which should be more fertile than the AB corresponding diploid hybrids.

Tetraploidization of diploid clones

Doubling AA and AB clone chromosomic stocks is done using colchicine application on proliferating plants, immersed in liquid culture medium. The selection of tetraploid plants is now made easier by the use of flow cytometry, a reliable method, faster than the chromosome counting previously used. It also allows to distinguish rapidly true tetraploid plants from chimerical myxoploid plants.

We already hold 19 doubled diploid clones and will then soon be able to increase significantly the parental combinations leading to the creation of new triploid varieties.

Creation of AAA and AAB triploid varieties

Creating triploid hybrids was done in 1994 using the following schemes :

AA (female) x AAAA (cultivar, male) --> AAACv (3X - monospecific)
 BB (wild, female) x AAAA (cultivar, male) --> AABcv (3X - interspecific)

Nearly 110 AAB hybrids and 450 AAA hybrids have been planted in 1994 and are presently being evaluated. The more interesting ones are indexated and kept in vitro while copies are sent to Cameroon to be evaluated against BLSD.

SELECTION OF NEW CLONES

IRFA 903, a natural mutant, selected for varietal diversification in export bananas : IRFA 903 is a hardy variety, resistant to BLSD, Yellow Sigatoka and Panama Disease. It products sweet small sized fruits. In established culture, it may be harvested two times and a half per year. The averag bunch weight is 15 kg, which is equivalent to a raw 55T/ha/year yield in the experimental conditions of Neufchâteau. Associated to SICA-Karubana, we have begun in 1994 a study in Guadeloupe to establish the technical constraints of its cultivation and packaging, and to assess the impact of this new variety on consumers.

IRFA 910, IRFA 912 and others : Following the first results obtained with IRFA 909 in 1993, we selected in the same family another hybrid, IRFA 910 (AABcv), with a longer cycle but bigger fruits. Among cooking bananas, we selected another hybrid (IRFA 912 - AABcv) closely related to Laknao, but which may moreover be resistant to BLSD.

New hybrids follow these first selections. We will then be able to raise our choice criteria values (yield, bunch quality, fruit quality, ...) in order to select only first quality products.

L'amélioration génétique des bananiers

F. Bakry & C. Jenny

CIRAD-FLHOR, Station de Neufchâteau, Sainte Marie, 97130 Capesterre Belle Eau, Guadeloupe, FWI.

La Maladie des Raies Noires (MRN), et la Maladie de Panama sont certainement les deux maladies les plus graves du bananier. La Guadeloupe et la Martinique ne sont pas encore atteintes par la MRN mais ces deux îles sont dans une situation extrêmement précaire puisque cette maladie est déjà présente à Cuba au nord et au Vénézuéla au sud.

Face à ces menaces, le CIRAD-FLHOR a mis en place depuis 1983, un programme d'amélioration génétique des bananiers pour l'exportation et pour les consommations locales grâce à l'appui de l'UE (Programme STD). Ce programme est développé en collaboration avec le CIRAD à Montpellier (FLHOR, BIOTROP /AGETROP), les universités d'Orsay à Paris, de Leuven et de Gembloux en Belgique, le CATIE au Costa-Rica et le CRBP au Cameroun. Ce programme d'amélioration génétique et de sélection de bananiers, avec pour objectifs d'identifier, de créer et ensuite, de promouvoir de nouvelles variétés résistantes ou plus tolérantes à ces maladies et ravageurs, a développé deux axes prioritaires de recherche:

- l'amélioration des bananiers à cuire de culture villageoise et des marchés intérieurs pour lesquels aucun intrant n'est utilisé dans les conditions traditionnelles de culture.
- la sélection de bananiers de type dessert pour l'exportation et les consommations locales.

En Guadeloupe, le programme d'amélioration génétique des bananiers repose sur l'amélioration des clones diploïdes, base de la synthèse de variétés triploïdes performantes. Ce schéma se décompose en quatre étapes successives fondamentales:

- l'obtention de lignées (plantes homozygotes), diploïdes et fertiles.
- la création d'hybrides F1 diploïdes "élites" (hétérozygotes) par croisement de ces lignées pures entre elles. Les hybrides F1 peuvent être d'origine monospécifique (M. acuminata) ou d'origine interspécifique (M. acuminata/ M. balbisiana), comme les variétés naturelles.
- le doublement du stock de chromosomes de ces hybrides F1 par un traitement à la colchicine pour obtenir des plantes tétraploïdes ($4X = 2 \text{ fois } 2X$).
- et enfin, la synthèse d'hybrides triploïdes (3X), en croisant une plante tétraploïde (4X) obtenue dans l'étape précédente avec une autre lignée diploïde (2X).

LES RESSOURCES GENETIQUES

Les travaux en Ressources Génétiques sur la station de Neufchâteau, consistent à collecter et conserver les clones en collection, afin de les identifier et évaluer leur potentiel pour la création variétale et la sélection.

La collection de Neufchâteau contient aujourd'hui près de 400 accessions. Elle s'est enrichie en 1994, de 12 nouvelles accessions en provenance de Cuba et de 29 accessions des prospections faites en Papouasie Nouvelle Guinée. Parmi ces dernières, certaines sont des diploïdes AACv à cuire qui doivent être considérées comme des formes ancestrales des bananiers triploïdes à cuire actuels. Celles qui sont résistantes à la MRN (évaluation faite au CRBP), seront utilisées en croisement très prochainement.

LA CREATION VARIETALE

La recherche de lignées: l'androgénèse du bananier.

Voir la présentation sur l'androgénèse du bananier (F. Kerbellec & F. Bakry) dans cette même réunion.

La création d'hybrides F1

Pour 1994, elle concerne exclusivement la création d'hybrides interspécifiques AB selon le schéma exposé avant:



Ces hybrides varient beaucoup des uns aux autres mais ils ont tous en commun une fertilité pollinique très faible. Parmi les 135 diploïdes interspécifiques plantés, 10 seulement ont été retenus en 1994. Ce sont des plantes parthénocarpiques qui ont hérité de la bonne vigueur et du bon ancrage dans le sol du parent balbisiana. Ces hybrides sont actuellement passés *in vitro* pour être doublés à la colchicine afin d'obtenir des allotétraploïdes AABB qui devraient être plus fertiles que les diploïdes AB correspondant.

La tétraploïdisation des clones diploïdes.

Le doublement des clones AA et AB est effectué par l'application de colchicine sur des touffes de plantes en prolifération immergées dans des milieux de culture liquides. La recherche des plantes tétraploïdes est facilitée désormais par l'utilisation de la cytométrie en flux, méthode sûre, beaucoup plus rapide que le comptage de chromosomes fait précédemment. Elle permet, en outre, de distinguer rapidement les plantes véritablement tétraploïdes des chimériques mixoploïdes.

Nous recensons actuellement 19 clones diploïdes doublés qui nous permettront d'augmenter significativement les combinaisons de parents menant à la création de nouvelles variétés triploïdes.

La création de variétés triploïdes AAA et AAB. En 1994, la création des triploïdes a été faite selon les schémas suivants:



Près de 110 hybrides AAB et 450 hybrides AAA ont été plantés en 1994 et sont en cours d'observation. Les plus intéressants sont indexés, réintroduits in vitro, et envoyés au Cameroun pour être évalués pour leur résistance à la MRN.

LA SELECTION DE NOUVEAUX CLONES

IRFA903, un mutant naturel, sélectionné pour la diversification variétale à l'exportation: IRFA903 est une variété rustique, résistante à la MRN, la Cercosporiose jaune et la Maladie de Panama. Elle produit des fruits sucrés, de petite taille. En culture établie, elle autorise deux récoltes et demi par an ; le poids moyen des régimes est de 15 kg, ce qui équivaut à une productivité brute de 55 T/Ha/an environ dans les conditions expérimentales de la station de Neufchâteau. En relation avec la SICA-Karubana, une étude a débuté en 1994, en Guadeloupe, pour déterminer les itinéraires techniques appropriés à sa culture, étudier son conditionnement et évaluer l'impact de cette nouvelle variété sur les consommateurs.

IRFA910, IRFA912 et autres: à la suite du premier hybride IRFA909, obtenu en 1993, un autre descendant de la même famille, plus tardif mais à fruits plus gros, a été sélectionné et baptisé IRFA910 (AABcv) en 1994. Parmi les bananiers à cuire, nous avons sélectionné entre autres, un clone baptisé IRFA912 (AABcv), rappelant les Laknao, mais qui de surcroît pourrait être résistant à la MRN.

De nouveaux hybrides suivent ces premières sélections. Nous serons alors en mesure de relever la valeur de nos critères de choix (rendement, qualité des régimes, des fruits, etc...) pour ne délivrer que des produits de première qualité.

Plantain breeding at the CRBP: Objectives, Strategies And Results.

K. Tomekpe, E. Auboiron et P. Noupadja

Centre Regional de Recherches sur Bananiers et Plantains; (CRBP) Cameroun

Plantain breeding at the CRBP aims to create plantain-like tetraploid hybrids from the scheme AAB (plantain) x AA == > AAA. These hybrids have to be mainly parthenocarpic and resistant to black leaf strat. They have to combine pendulous bunch, good ratooning, insignificant fertility, good culinary and sensorial qualities, shorter height and cycle than their plantain parents.

Breeding program developed since 1992 at the CRBP allowed the selection of six promising plantain-like tetraploid through two cycles of preliminary evaluation. These hybrids are undergoing clonal evaluation at the CRBP in order to corroborate their resistance to black leaf streak and their agronomic and culinary characteristics.

Twenty other tetraploid and a few plantain-like triploids are undergoing preliminary evaluation.

These hybrids are issued from French plantains pollinated with wild diploid *Musa acuminata burmanicoides*, type Calcutta 4 or the parthenocarpic hybrid M53. This improved hybrid parent originated from Jamaica is the backbone of the CRBP male parents improvement strategy. M53 is undergoing inbreeding selection through a process of successive selfings/selections in order to create elite inbred or pure lines. At present, the best progenies issued from the M53 selfing are used as male parents in AAB x AA breeding. The male program will also be supported by the large diploid germplasm of CRBP, 60 varieties among 345 accessions of the CRBP active collection are AA diploids, 20 cooking AA bananas from Papua New Guinea, 60 improved AA hybrids from CIRAD-FLHOR/Guadeloupe and promising plantain-like diploids from AAB x AA breeding are undergoing evaluation. The best individuals will be used as male parents in the breeding program.

To optimize tetraploid hybrid production plots of French plantains showing the best 2nx 3x female gametes production rates have been created. Their plantation has been planned over several months in order to study seasonal effect on hybrid production and determine the best crossing periods.

The next objective of the CRBP conventional breeding program is the creation of plantain-like and other cooking type triploid hybrids from the scheme AABB (AB double by colchicine) x AA == > AAB and AABB x BB == > ABB. These hybrids will have to present similar qualities to tetraploid hybrids. As the triploid cultivars, they will have to be male and female sterile or present insignificant female fertility. Priority will be given to this new objective of the conventional breeding program. This new breeding option will progressively replace the 3X/2X breeding and its realization will require close cooperation with the CIRAD-FLHOR/Guadeloupe program that has already obtained interesting results through this triploid creation strategy.

Concerning non-conventional breeding, various collaborations are needed to develop techniques required for gene insert in triploid cultivars. The CRBP already contributes to this collaboration through its work on plantain cell suspensions (French Sombre, French Clair, Kelong Mekintu). A few embryogenic calluses have been obtained. Conformity of French Sombre plants regenerated by somatic embryogenesis has been verified within the first cycle on populations issued from different suspensions.

The CRBP has undertaken the obtention of cooking type AA diploid bananas embryogenic calluses in order to create cell suspensions. This work is a step towards the creation of triploid hybrids through fusion of diploid and haploid protoplasts.

L'amélioration génétique des plantains au CRBP: Objectifs, Stratégies et Résultats

K. Tomekpe, Auboiron et P. Noupadja

Centre Regional de Recherches sur Bananiers et Plantains; (CRBP) Cameroun

Le programme d'amélioration génétique des plantains au CRBP vise la création d'hybrides tétraploïdes de type plantain à partir du schéma AAB (plantain) x AA == AAAB. Ces hybrides doivent être principalement parthénocarpiques et résistants à la cercosporiose noire. Ils doivent avoir un régime perdant, une fertilité négligeable, des qualités organoleptiques appréciables, un meilleur rejouage, une taille et un cycle plus courts que leurs parents plantains.

Les travaux d'amélioration menés depuis 1992 au CRBP ont permis de sélectionner 6 hybrides tétraploïdes de type French plantain à l'issue de deux cycles d'évaluation préliminaire. Ces hybrides vont subir prochainement une évaluation clonale pour confirmer leur résistance à la cerosporiose noire et leurs qualités agronomiques et organoleptiques. vingt autres hybrides tétraploïdes et quelques diploïdes de type plantain sont en cours d'évaluation préliminaire.

Ces hybrides sont issus de plantains hybrides avec du pollen de *M. acuminata burmanicoïdes*, type Calcutta 4 ou de l'hybride perthénocarpique M53. Cet hybride synthétique originaire de Jamaïque constitue le pilier de notre programme mâle il est à l'origine d'un processus de sélection généalogique pour sélectionner des parents mâles élités homozygotes. Les meilleurs descendants issus de l'autofécondation de M53 sont actuellement testés en hybridation. Le programme mâle va également s'appuyer sur le vaste germoplasme diploïde du (RBP: 60 des 345 accessions de la collection active du CRBP sont des diploïdes AA incluant diploïde AA de type à cuire en provenance de Papouasie-Nouvelle Guinée une soixantaine d'hybrides AA introduits du CIRAD-FLHOR de Guadeloupe et les hybrides diploïdes de type plantain issus du schéma AAB x AA sont en cours d'évaluation. Les meilleurs individus serviront de parents mâles dans le programme d'hybridation.

Des parcelles d'hybridation constituées des plantains ayant les meilleurs taux de production d'ovules non réduits $2n = 3x$ ont été installées en vue d'optimiser la production de tétraploïdes. Leur plantation a été échelonnée dans le temps afin d'étudier l'influence des saisons sur la production d'hybrides et de déterminer les meilleures périodes de croisement.

Le prochain objectif du programme d'amélioration conventionnelle du CRBP est de créer des hybrides triploïdes de type plantain et autre banane à partir du schéma AABB (AB doublé avec la colchicine) x AA \Rightarrow AAB et AABB x BB \Rightarrow ABB. Ces hybrides devront présenter des qualités semblables aux hybrides tétraploïdes. A l'instar des cultivars triploïdes, ils devront avoir une stérilité mâle absolue et une fertilité femelle nulle ou négligeable. La concrétisation de ce nouveau schéma, appelé à remplacer progressivement les hybridations AAB x AA, nécessitera l'appui scientifique du CIRAD-FLHOR de Guadeloupe qui a déjà obtenu des résultats intéressants avec cette stratégie de création des triploïdes.

Concernant l'amélioration non conventionnelle, la mise au point des outils nécessaires à la stratégie de transfert de gènes des cultivars triploïdes met en jeu des collaborations multiples. Le CRBP y participe en travaillant à la maîtrise des suspensions cellulaires régénérantes sur plusieurs plantains (French Sombre, French Clair, Kelong Mekintu). Quelques cals de type embryogénèse somatique ont pu être vérifiés en premier cycle sur des populations issues de différentes suspensions.

L'obtention de cals embryogènes de diploïdes AA de type à cuire en vue de la création de suspensions cellulaires a été initiée au CRBP. Cette opération constitue une étape pour l'application du schéma de création d'hybrides triploïdes par fusion de protoplastes diploïdes et haploïdes.

El mejoramiento genético de *Coffea arabica* en América Central

Benoît BERTRAND*, Francois ANTHONY**

(*)CIRAD CP/ PROMECAFE AP 55, 2200 CORONADO, San José, Costa Rica

(**)ORSTOM/CATIE, Unidad de Biotecnología, CATIE, 7170, Turrialba, Costa Rica

Las variedades del café Arábica sembradas en América Central provienen en su mayoría de una base genética estrecha y que carece de los genes de resistencia a las principales enfermedades y plagas. Un programa de selección genealógica, a base de cruces iniciales con el Híbrido de Timor, se desarrolló a partir de 1980 y dio origen a las nuevas variedades Catimores. Algunas de ellas superan a las variedades tradicionales, razón por la cual se comienza su liberación a los caficultores. Lo esencial del progreso genético que expresan éstas nuevas variedades proviene de la resistencia a la roya y en menor parte a los nematodos, conferidos por el padre Híbrido de Timor. Trabajos recientes demuestran igualmente que algunas líneas de Catimores expresan un cierto grado de resistencia al *Coffee Berry Disease*. El programa de selección de los Catimores está por acabarse. Se propone la recombinación de las mejores líneas y el enriquecer la base genética a partir de individuos silvestres (Etiopes), que se encuentran en la colección del CATIE. Las características agronómicas de los padres Etiopes son brevemente descritas y se presenta el programa de creación de híbridos F1.

L'amélioration génétique de *coffea arabica* en Amérique Centrale.

Benoît BERTRAND*, Francois ANTHONY**

(*)CIRAD CP/ PROMECAFE AP 55, 2200 CORONADO, San José, Costa Rica

(**)ORSTOM/CATIE, Unidad de Biotecnología, CATIE, 7170, Turrialba, Costa Rica

Le verger du caféier Arabica d'Amérique Centrale, est composé en majorité de variétés issues d'une base génétique étroite et dépourvue des gènes de résistance aux principales maladies et parasites. Un programme de sélection généalogique, à partir de croisements initiaux faisant intervenir l'Hybride de Timor, s'est développé à partir de 1980. De nouvelles variétés- les Catimors - en sont issues. Certaines s'avèrent supérieures aux variétés traditionnelles et commencent à être diffusées aux caféiculteurs. L'essentiel du progrès génétique provient de la résistance à la rouille et dans une moindre mesure aux nématodes, conférées aux nouvelles variétés par le parent Hybride de Timor. Des travaux récents montrent également que les Catimors possèdent une résistance potentielle au *Coffee Berry Disease*. Le programme de sélection généalogique des Catimors touchant à sa fin, il est proposé de recombiner les lignées les plus intéressantes et d'élargir la base génétique à partir des individus sauvages (Ethiopiens), conservés au CATIE. Les caractéristiques agronomiques des parents Ethiopiens sont passées en revue et le programme de création d'hybrides F1 est décrit.

Resistencias genéticas a plagas y enfermedades de la piña

Geo Coppens d'Eeckenbrugge, CIRAD-FLHOR/IPGRI, AA 6713 (CIAT), Cali, Colombia

Aristoteles Pires de Matos, EMBRAPA-CNPMP, Cruz das Almas, Bahía, Brasil

Freddy Leal, UCV Maracay, Venezuela

Para modernizar e intensificar sus cultivos, los productores de piña para mercados locales adoptan el cultivar Cayena Lisa y la tecnología desarrollada por empresas que intervienen en el mercado internacional, con un creciente costo económico y ambiental. El grave riesgo fitosanitario asociado a la reducción de la base genética del cultivo ha justificado amplios programas de mejoramiento pero éstos no han logrado una diversificación varietal y la información obtenida sobre la herencia de los caracteres de resistencia es fragmentaria. La constitución de importantes colecciones de germoplasma es todavía demasiado reciente para su exploración sistemática y la identificación de fuentes de resistencia.

Resistencia a nemátodos e insectos

Cinco especies de nemátodos tienen una importancia significativa a nivel mundial: *Meloidogyne javanica* y *M. incognita*, *Pratylenchus brachiurus*, *Rotylenchulus reniformis*, y *Helicotylenchus* sp. Las variedades 'Cayena Lisa' y 'Española Roja' son susceptibles a *M. incognita* y *Rotylenchulus reniformis*. 'Manzana', 'Natal' ('Queen'), 'Pernambuco' ('Pérola'), 'Wild Kailua', y los híbridos obtenidos con esta última, mostraron tolerancia [1-3]. 'Pérola' también fue el cultivar menos infestado en dos ensayos sobre la susceptibilidad a *Pratylenchus brachiurus* [4]. 'Manzana' resultó susceptible a *Pratylenchus neglectus* [3]. *Ananas ananassoides* y *A. bracteatus* son generalmente resistentes a los nemátodos [1, 2].

Thecla basilides, un lepidóptero cuya larva cava galerías en los frutos, constituye una limitación importante para el cultivo de la piña en Suramérica. Mientras el cultivar Cayena Lisa es altamente susceptible, las larvas no alcanzan a penetrar las inflorescencias de los cultivares peruanos Samba y Roja Trujillana [5]. Esta resistencia de probable origen mecánico podría existir para las larvas de moscas que ponen sus huevos sobre la inflorescencia.

Resistencia a hongos

Las pudriciones del corazón y de las raíces, causadas por *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* y *P. cinnamoni* se encuentran en la mayoría de las zonas de producción. Son muy severas en condiciones de pH y humedad altos. Como la infección por *P.n. parasitica* ocurre mediante la proyección de gotas de lluvia y tierra en la roseta de las plantas jóvenes, las variedades con un porte erecto deberían contaminarse menos. 'Queen' se considera susceptible, y 'Cayena Lisa', 'Española Roja', y 'Singapore Spanish' tolerantes [6]. El híbrido hawaiano '53-323' es muy resistente a *P. cinnamoni* y muy susceptible a *P.n. parasitica*, mientras el híbrido '59-656' es resistente a ambos patógenos [7]. La resistencia de *A. ananassoides* y *A. bracteatus* se transmite a su descendencia híbrida [8].

La fusariosis, causada por *Fusarium subglutinans*, es la enfermedad más grave de la piña en Brasil. Ha sido observada también en Bolivia sobre 'Española Roja' [9], en Paraguay (Duval com. pers.), y en Chile sobre frutos en un mercado [10]. Se la puede considerar la principal amenaza para la piñicultura americana. *F. subglutinans* es capaz de infectar cualquier parte de la planta, provocando la exudación de una sustancia gomosa a partir de los tejidos infectados. Dado su impacto económico, EMBRAPA empezó un programa de mejoramiento para resistencia. Ensayos con inoculaciones artificiales y observaciones de campo mostraron la susceptibilidad de la mayoría de las variedades, incluyendo las cuatro más cultivadas a nivel mundial, 'Cayena Lisa', 'Queen', 'Singapore Spanish' y 'Española Roja', y la resistencia de 26 variedades cultivadas y clones de otras especies de los géneros *Ananas* y *Pseudananas*. Los cultivares resistentes 'Perolera' y 'Primavera', el *A. bracteatus* 'Sao Bento', y los cultivares tolerantes 'Roxo de Tefé' y 'Guiana' se cruzaron principalmente con 'Cayena Lisa' y 'Pérola' y produjeron más de 23000 híbridos. En primera generación, todos los híbridos entre genitores susceptibles y resistentes son resistentes, mientras que los híbridos entre variedades susceptibles son susceptibles, lo que sugiere un mecanismo genético simple y dominante [11].

La pudrición negra, causada por *Chalara paradoxa* (syn. *Thielaviopsis*) afecta el material de plantío y los frutos, entrando por las heridas producidas al cosechar estas partes. Se han observado diferencias varietales, 'Cayena Lisa' mostrándose más susceptible que 'Española Roja' [7].

La enfermedad de la mancha negra del fruto es causada principalmente por *Penicillium funiculosum* y *Fusarium moniliforme*, pero también intervienen *Fusarium subglutinans*, la levadura *Candida guilliermondii*, y los ácaros *Steneotarsonemus ananas* y *Dolycho-tetranychus floridanus* [7]. Se manifiesta por una

suberización y/o una coloración marrón o negra del ojo, desarrollándose a partir de los lóculos. Su incidencia y la intervención de los distintos agentes es muy variable en el tiempo y entre las áreas de producción. En Martinica, las pérdidas de rodajas pueden alcanzar 25% o más en ciertas épocas. No se ha encontrado un método eficiente de control químico. 'Cayena Lisa', y más aún 'Queen' y 'Perolera', son susceptibles, 'Blanca' del Perú parece resistente o tolerante. Faltan todavía conocimientos básicos sobre la etiología de la enfermedad y pruebas estandarizadas para evaluar el germo-plasma existente o los híbridos. La resistencia a uno de los hongos no se refleja necesariamente en la resistencia al otro y los síntomas dependen de la variedad. Así, el híbrido hawaiano '53-116' desarrolla niveles de infección altos con *P. funiculosum* y bajos con *F. subglutinans*. El híbrido '58-114' muestra poca suberización entre los ojos pero altos niveles de mancha negra con ambos patógenos [7].

Resistencia a bacterias

La resistencia de la piña a las enfermedades bacterianas es muy poco documentada. 'Queen' y 'Singapore Spanish' son susceptibles a la pudrición de la fruta causada por *Erwinia chrysanthemi*, mientras que 'Cayena Lisa' resulta menos afectada [12].

Resistencia a enfermedades virales

La marchitez roja, una de las enfermedades más comunes y severas de la piña, es una enfermedad compleja que involucra a las cochinillas harinosas, *Dysmicoccus brevipes* y *D. neobrevipes*, y probablemente a un closterovirus o a un complejo viral. Las especies *A. ananassoides* y *A. bracteatus* son resistentes. El cultivar Pérola es tolerante. Han aparecido mutaciones que confieren resistencia al cultivar Cayena Lisa, resistencia que pudo ser transmitida por hibridación [13, 14]. Por otra parte, si se confirmara la relación de causalidad entre la enfermedad y la presencia de un virus en particular, se podría conferir una resistencia genética por transformación.

Desórdenes fisiológicos

El ennegrecimiento interno del fruto se ha relacionado con el frío y con una baja concentración en ácido ascórbico. La selección de variedades con un alto contenido de esta vitamina es lógicamente la mejor manera de conseguir una resistencia genética.

Perspectivas

Una preocupación prioritaria debe ser la de ampliar la base genética del cultivo con la promoción de variedades locales, generalmente más rústicas que la 'Cayena Lisa' y la creación de variedades que acumulen genes de resistencia. Simultáneamente, se debe rescatar y evaluar el germoplasma amenazado. Para ambos objetivos, el genetista necesita disponer de herramientas esenciales como las pruebas estandarizadas para evaluar su material vegetal. En el caso de la piña, hay demasiado campo libre para la colaboración entre genetistas y fitopatólogos.

Referencias

1. Collins, J.L. y H.R. Hagan, 1932. *J. Hered.*, 23:459-465, 503-511.
2. Ayala, A., E. González-Tejera, y H. Irizarry, 1969. In *Nematodes of tropical crops*, J.E. Peachey, Editor, CAB, p. 210-224.
3. Redondo-Echeverri, E. y F. Varón. 1992. *Fitopatología Colombiana*, 16(1-2):180-192.
4. Sarah, J.-L., L. Mesnildrey, E. Marguerite y M. Boisseau. 1996. *Acta Hort.*, in press.
5. Bello, S., H. Villachica, y A. Julca. 1996. *Acta Hort.*, in press.
6. Py, C., J.-J. Lacoëuilhe, y C. Teisson. 1984. *L'ananas, sa culture, ses produits*. G.P. Maisonneuve & Larose, Paris. 561pp.
7. Rohrbach, K.G. y D.P. Schmitt. 1994. In *Compendium of tropical fruit diseases*, R.C. Ploetz *et al.*, Ed., A.P.S. Press: St Paul, MI, p. 45-55.
8. Williams, D.D.F. y H. Fleisch. 1993. *Acta Hort.*, 334:67-76.
9. Matos, A.P.de, X. Mourichon, y A. Pinon. 1992. *Fruits*, 47:33.
10. Montealegre, J.R. y L.E. Luch-singer. 1990. *Fitopatología*, 25:51-53.
11. Cabral, J.R.S., A.P.de Matos, y G. Coppens d'Eeckenbrugge. 1996. *Acta Hort.*, in press.
12. Lim, W.H. y P.H. Lowings. 1979. *Plant Disease Reporter*, 63(3):170-174.
13. Torres Navarro, H., H. Lozoya Saldana, y D. Uriza Avila. 1989. *Rev. Chapingo*, 13-16(62-63):156-160.
14. Collins, J.L. 1960. *The pineapple, botany, utilisation, cultivation*. Leonard Hill Ltd., London 294pp.

Résistances génétiques aux maladies et ravageurs de l'ananas

Geo Coppens d'Eeckenbrugge, CIRAD-FLHOR/IPGRI, AA 6713 (CIAT), Cali, Colombie
 Aristoteles Pires de Matos, EMBRAPA-CNPMPF, Cruz das Almas, Bahía, Brésil
 Freddy Leal, UCV Maracay, Vénézuéla

Pour moderniser et intensifier leur production, les producteurs nationaux adoptent le cultivar Cayenne Lisse et la technologie développée par les entreprises intervenant sur le marché international, malgré leur coût et leur impact sur l'environnement. Le risque phytosanitaire associé à la réduction de la base génétique de la culture a justifié de larges programmes d'amélioration mais ceux-ci n'ont pas abouti à élargir la gamme variétale et l'information obtenue sur l'hérédité des caractères de résistance reste fragmentaire. La constitution d'importantes collections de germoplasme est encore trop récente pour avoir permis leur exploration systématique et l'identification de sources de résistances.

Résistances aux nématodes et insectes

Cinq espèces de nématodes sont importantes à l'échelle mondiale : *Meloidogyne javanica* et *M. incognita*, *Pratylenchus brachiurus*, *Rotylenchulus reniformis*, et *Helicotylenchus* sp. 'Cayenne Lisse' et 'Española Roja' sont susceptibles à *M. incognita* et *Rotylenchulus reniformis*. Les cultivars Manzana, Natal ('Queen'), Pernam-buco ('Pérola'), Wild Kailua, et les hybrides obtenus avec ce dernier, sont tolérants [1-3]. 'Pérola' a également été le cultivar le moins infesté lors de deux essais sur la susceptibilité à *Pratylenchus brachiurus* [4]. 'Manzana' est susceptible à *Pratylenchus neglectus* [3]. *Ananas ananassoides* et *A. bracteatus* sont généralement résistants aux nématodes [1, 2].

Thecla basilides, un lépidoptère dont la larve creuse des galeries dans les fruits, constitue une limitation importante de la culture de l'ananas en Amérique du Sud. Alors que le cultivar Cayenne Lisse y est très susceptible, les larves ne parviennent pas à pénétrer les inflorescences des cultivars péruviens Samba et Roja Trujillana [5]. Ce type de résistance, probablement d'origine mécanique, pourrait exister pour les larves des mouches qui pondent sur l'inflorescence.

Résistances aux champignons

Les pourritures du cœur et des racines, causées par *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* et *P. cinnamoni* se rencontrent dans la plupart des zones de production. Elles sont plus sévères en conditions humides et de pH élevé. L'infection par *P.n parasitica* se produisant par projection de gouttes de pluie et de terre dans les rosettes des jeunes plantes, un port érigé devrait réduire la contamination. 'Queen' est considérée susceptible, 'Cayenne Lisse,' 'Española Roja,' et 'Singapore Spanish' tolérantes [6]. L'hybride hawaïen '53-323' est très résistant à *P. cinnamoni* et très susceptible à *P.n. parasitica*, tandis que l'hybride '59-656' est résistant aux deux pathogènes [7]. La résistance d'*A. ananas-soïdes* et d'*A. bracteatus* se transmet à leur descendance hybride [8].

La fusariose, causée par *Fusarium subglutinans*, est la maladie la plus grave de l'ananas au Brésil et la principale menace en Amérique. Elle a été observée également en Bolivie sur 'Española Roja' [9], au Paraguay (Duval com.pers.), et au Chili sur un marché [10]. *F. subglutinans* peut infecter toutes les parties de la plante, provoquant une gommose dans les tissus infectés. A cause de son impact économique, l'EMBRAPA a lancé un programme d'amélioration pour la résistance. Des essais d'inoculations artificielles et les observations en champ ont montré la susceptibilité de la plupart des variétés, y compris les quatre les plus cultivées mondialement, 'Cayenne Lisse', 'Queen', 'Singapore Spanish' et 'Española Roja', et la résistance de 26 variétés cultivées et clones d'autres espèces des genres *Ananas* et *Pseudananas*. Les cultivars résistants 'Perolera' et 'Primavera', l'*Ananas bracteatus* 'Sao Bento', et les cultivars tolérants 'Roxo de Tefé' et 'Guiana' ont été croisés principalement avec 'Cayenne Lisse' et 'Pérola' pour produire plus de

23000 híbridos. En première génération, tous les hybrides entre géni-teurs susceptibles et résistants sont résistants, tandis que les hybrides entre variétés susceptibles sont susceptibles, ce qui suggère un mécanisme génétique simple et dominant [11].

La pourriture noire des fruits et des rejets, causée par *Chalara paradoxa* (syn. *Thielaviopsis*) pénètre par les blessures produites lors de leur récolte. Des différences variétales ont été observées, 'Cayenne Lisse' se montrant plus susceptible que 'Española Roja' [7].

La maladie des taches noires est causée principalement par *Penicillium funiculosum* et *Fusarium moniliforme*. *Fusarium subglutinans*, la levure *Candida guilliermondii* et les acariens *Steneotarsonemus ananas* et *Dolycho-tetranychus floridanus* peuvent aussi y être associés [7]. Elle se manifeste par une subérification externe et/ou une coloration interne marron ou noire des yeux se développant à partir des loges ovariennes. Son incidence et l'intervention des différents agents est très variable dans le temps et entre les zones de production. En Martinique, les pertes peuvent dépasser 25% des tranches à certaines époques. Il n'existe pas de contrôle chimique. 'Cayenne Lisse', et surtout 'Queen' et 'Perolera', sont susceptibles, 'Blanca' du Pérou semble résistante ou tolérante. Les connaissances de base sur l'étiologie de la maladie et des tests standardisés de résistance manquent pour évaluer le germoplasme existant et les hybrides. La résistance pour l'un des agents n'est pas nécessairement liée à celle pour un autre et les symptômes dépendent de la variété. Ainsi la susceptibilité de l'hybride hawaïen '53-116' est forte avec *P. funiculosum* et faible avec *F. subglutinans*. Avec les deux pathogènes, l'hybride '58-114' ne montre pas de subérification entre les yeux mais de nombreuses taches noires [7].

Résistances aux bactéries

La résistance aux maladies bactériennes de l'ananas est peu connue. 'Queen' et 'Singapore Spanish' sont susceptibles à la pourriture du fruit causée par *Erwinia chrysanthemi*, tandis que la 'Cayenne Lisse' est moins affectée [12].

Résistance aux maladies virales

Le wilt, une des maladies les plus communes et les plus graves de l'ananas, est une maladie complexe impliquant les cochenilles *Dysmi-coccus brevipes* et *D. neobrevipes*, et probablement un clostérovirus ou un complexe viral. Les espèces *A. ananassoides* et *A. bracteatus* sont résistantes. Le cultivar Pérola est tolérant. Des mutants résistants sont apparus chez 'Cayenne Lisse' ; cette résistance est transmissible [13, 14]. Par ailleurs, si une relation de causalité entre la maladie et la présence d'un virus était confirmée, la résistance génétique pourrait être conférée par transformation.

Désordres physiologiques

La sélection pour une teneur élevée en acide ascorbique semble la meilleure manière d'obtenir une résistance au brunissement interne du fruit.

Perspectives

L'élargissement de la base génétique de la culture, qui doit être une préoccupation prioritaire, passe par la promotion de variétés locales, généralement plus rustiques que la 'Cayenne Lisse', et la création de variétés accumulant des gènes de résistance. Simultanément, il faut sauver et évaluer le germoplasme menacé. Pour

ces deux objectifs, le généticien doit disposer d'outils aussi essentiels que les tests standardisés pour évaluer son matériel végétal. Dans le cas de l'ananas, l'espace de collaboration entre généticiens et phytopathologistes est encore largement inoccupé.

Références

1. Collins, J.L. et H.R. Hagan, 1932. *J. Hered.*, 23:459-465, 503-511.
2. Ayala, A., E. González-Tejera, et H. Irizarry, 1969. In *Nematodes of tropical crops*, J.E. Peachey, Editor, CAB. p. 210-224.
3. Redondo-Echeverri, E. et F. Varón. 1992. *Fitopatología Colombiana*, 16(1-2):180-192.
4. Sarah, J.-L., L. Mesnildrey, E. Marguerite et M. Boisseau. 1996. *Acta Hort.*, in press.
5. Bello, S., H. Villachica, et A. Julca. 1996. *Acta Hort.*, in press.
6. Py, C., J.-J. Lacoeyllhe, et C. Teisson. 1984. *L'ananas, sa culture, ses produits*. G.P. Maisonneuve & Larose, Paris. 561pp.
7. Rohrbach, K.G. et D.P. Schmitt. 1994. In *Compendium of tropical fruit diseases*, R.C. Ploetz *et al.*, Ed., A.P.S. Press: St Paul, MI, p. 45-55.
8. Williams, D.D.F. et H. Fleisch. 1993. *Acta Hort.*, 334:67-76.
9. Matos, A.P.de, X. Mourichon, et A. Pinon. 1992. *Fruits*, 47:33.
10. Montealegre, J.R. et L.E. Luch-singer. 1990. *Fitopatología*, 25:51-53.
11. Cabral, J.R.S., A.P.de Matos, et G. Coppens d'Eeckenbrugge. 1996. *Acta Hort.*, in press.
12. Lim, W.H. et P.H. Lowings. 1979. *Plant Disease Reporter*, 63(3):170-174.
13. Torres Navarro, H., H. Lozoya Saldana, et D. Uriza Avila. 1989. *Rev. Chapingo*, 13-16(62-63):156-160.
14. Collins, J.L. 1960. *The pineapple, botany, utilisation, cultivation*. Leonard Hill Ltd., London 294pp.

III. LAS TECNICAS MODERNAS DEL MEJORAMIENTO GENETICO - *LES TECHNIQUES MODERNES DE L'AMELIORATION GENETIQUE*

LOS HAPLOMETODOS / *LES HAPLOMETHODES*

Androgenesis in banana.

F. Kerbellec ; F. Bakry.

CIRAD-FLHOR, station of Neufchâteau, Ste-Marie, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe.

Diploid parthenocarpic varieties used in breeding programmes, are very heterozygous which is difficult to exploit in crossing. The obtention of homozygous plants should allow to optimize the creation of new triploid and tetraploid varieties. In this context, our laboratory is investigating the *in vitro* production of dihaploid plants by anther cultures.

Induction without pretreatment : 45 days after the culture, from 1.5 to 4 % of the anthers of the clones 'Paliama' (AAw), 'Pisang Klutuk' (BBw), 'M53' (AAcv), 'Galeo' (AAcv) and 'Tomolo' (AAcv) induced androgenetic calli. At the optimum stage of anthers output, the majority of the microspores are at the medium uninucleate stage which correspond to the regression of the vacuole and the initiation of the synthesis of starch. Unlike the other clones, the anthers of the responsive genotypes produce few phenols and callogenesis of the somatic tissues is reduced.

Effect of pretreatment : as opposed of the previous, the wild clone 'Pahang' (AAw) needs a nutritive privation to obtain from 10 to 24 % of responsive anthers. Some direct observations or on histologic preparations have showed that this pretreatment induced, before the anthers culture, several successive divisions in the microspores of little size, without knowing yet if these microsporal populations which are inhibited in their normal development are at the origin of all the androgenetic calli in banana.

Regeneration phase : about 40 % of androgenetic calli have regenerated plants, a few ones by direct embryogenesis, but most of them by caulinar organogenesis after the transfer of calli into a proliferation medium enriched with cytokinins. Calli from only the clones 'Pahang', 'Pisang Klutuk' and 'M53' have regenerated whole plants.

Regenerated plants studies : ploidy analysis by flow cytometry have been performed into 30 androgenetic explants (plants or buds) : 9 % are haploids, 13 % are dihaploids, 3 % are tetraploids and 5 % are chimeric mixoploids. Some analysis by RFLP have revealed the homozygosity of the diploid plants, which prove their microsporal origin. Pollen plants of the clone 'Pahang' have been acclimated and put in field. Haploid plants, too spindly, have died after plantation. Diploid plants grow more slowly than donor plants and florescence is not yet happened : their leaves have numerous black spots not present in the donor parents.

Conclusion and perspectives : these results are too recent to envisage the application of this methodology for a large production of pure lines with numerous banana genotypes. Nevertheless, for breeding of banana, these works could now have two important applications with the most responsive genotype in androgenesis, 'M53' (AAcv) and 'Pisang Klutuk' (Bbw).

- The first one would be to develop the production of pure lines in the cultivar 'M53'. Because of its quality of the regime and its resistance to the diseases, this cultivar is the actual male genitor in the crossings 3X/2X for the synthesis of tetraploids realised in CRBP-Cameroun. An early selection put on these lines would allow the optimization of these crossing, with a valuable economy of space and time.

- The second would be the fusion of protoplasts $2X+X$ from haploid androgenetic calli of *balbisiana* (BB) and from isolated embryogenic cell cultures of the *acuminata* diploids, for the synthesis of new AABcv triploids. With this technique, we hope to access to new parental combinations, not feasible at this day because of the often total sterility of the *acuminata* clones.

Abbreviations. w : wild diploid. cv : parthenocarpic cultivar.

Androgénèse chez le bananier.

F. Kerbellec ; F. Bakry.

CIRAD-FLHOR, station de neufchâteau, Ste Marie, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe.

Les variétés 2X parthénocarpiques, utilisables pour les programmes d'hybridation, présentent une forte hétérozygotie difficile à exploiter en croisement. L'obtention de plantes homozygotes permettrait d'optimiser la création de nouvelles variétés triploïdes et tétraploïdes. Pour cela, notre laboratoire développe actuellement une technique de production *in vitro* de plantes dihaploïdes à partir de la culture d'anthères.

L'induction sans prétraitement inducteur : après 45 jours de culture, 1.5 à 4 % des anthères des clones 'Paliama' (AAs), 'Pisang Klutuk' (BBs), 'M53' (AAcv), 'Galéo' (AAcv) et 'Tomolo' (AAcv) induisent des cals androgénétiques. Au stade optimal de prélèvement des anthères, les microspores sont majoritairement au stade uninucléé médian, ce qui correspond à la phase de régression vacuolaire et au début de la synthèse des réserves amyliacées. Contrairement à d'autres clones, les anthères de ces génotypes réactifs produisent peu de phénols et la callogénèse des tissus somatiques est en général réduite. Chez le cultivar 'M53', le fort pourcentage de petits grains stériles contenus dans les anthères (40 %) ne semble pas limiter l'induction de cals androgénétiques.

Effet des prétraitements inducteurs : à l'inverse des précédents, le clone sauvage 'Pahang' (AAs) nécessite un prétraitement de privation nutritive pour obtenir 10 à 24 % d'anthères réactives. Des observations directes et sur coupes histologiques ont montré que ce prétraitement induit, avant la mise en culture des anthères, plusieurs divisions successives dans les microspores de petite taille, sans que l'on sache encore si ces populations polliniques bloquées dans leur développement, sont à l'origine de tous les cals androgénétiques chez le bananier.

La phase de régénération : près de 40 % des cals androgénétiques ont régénéré des plantes, quelques-unes par embryogenèse directe mais la plupart par organogenèse caulinaire, après le transfert de ces cals sur un milieu enrichi en cytokinines. Seuls les cals issus des clones 'Pahang', 'P. Klutuk' et 'M53' ont permis la régénération de plantes entières.

Etude des plantes régénérées : des analyses de ploïdie ont été réalisées par cytométrie en flux sur 30 explants androgénétiques (plantes ou bourgeons) : 9 sont haploïdes, 13 sont dihaploïdes, 3 sont tétraploïdes et 5 sont des chimères mixoploïdes. Des analyses par RFLP de ce matériel ont confirmé l'homozygotie des plantes diploïdes, ce qui prouve leur origine microsporale. Les plantes de 'Pahang' obtenues par androgénèse ont été sevrées et plantées au champ. Les plantes haploïdes, trop grêles, n'ont pas survécu à la plantation. Les plantes diploïdes poussent plus lentement que les plantes donneuses et n'ont pas encore fleuri : leurs feuilles présentent également de nombreuses taches noires absentes chez le parent donneur.

Conclusion et perspectives : ces résultats sont encore trop récents pour envisager d'appliquer cette méthodologie à la production massive de lignées pures chez de nombreux génotypes de bananier. Cependant, pour l'amélioration du bananier, ces travaux pourraient dès à présent avoir deux applications chez les clones les plus réactifs à l'androgénèse, 'M53' et 'Pisang Klutuk' :

- la première serait de développer la production de lignées chez le cultivar M53. Ce cultivar, de par ses qualités de régime et de résistance aux maladies, est actuellement le géniteur mâle des croisements 3X/2X pour la synthèse des tétraploïdes réalisée au CRBP-Cameroun. Une sélection précoce effectuée sur ces lignées permettrait d'optimiser ces croisements, avec un moindre coût en espace et en temps.

- la seconde serait la fusion de protoplastes $2X+X$ à partir des cals androgénétiques haploïdes des clones *balbisiana* (BB) et des cellules embryogènes isolées des diploïdes *acuminata*, pour la synthèse de nouveaux triploïdes AABcv. Par cette technique, nous espérons pouvoir accéder à de nouvelles combinaisons parentales, irréalisables aujourd'hui avec des clones de *M. acuminata* totalement stériles.

Abbreviations. s : diploïde sauvage. cv : cultivar parthénocarpique.

14/ **Gynogenèse induite par pollen irradié chez le bananier *Musa acuminata* C.**

Jean-Vincent Escalant, Humberto Leblanc, Jose Luis Moreno.

CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

Dans le cadre de l'amélioration génétique des bananiers et plantains, l'obtention de plantes homozygotes à partir des diploïdes séminifères est d'une grande importance. La culture de tissus et les haplométhodes devraient permettre l'obtention plus rapide de telles plantes. La gynogenèse induite par pollen irradié a été étudiée à partir de l'espèce *Musa balbisiana* type TANI en croisement avec *Musa acuminata* ssp *burmannicoïdes* et *Musa acuminata* ssp *malaccensis*, alors que dans le cas des essais à partir d'espèces ornementales les travaux ont été réalisés avec *Musa ornata* y *Musa becarii* comme source de pollen. Le pollen conserve plus de 50% de ses capacités à germer même après une irradiation à 1000 gray. le tube germinatif se développe et peut atteindre l'ovule quelque soit la dose d'irradiation utilisée. Dans le cas du pollen irradié, on a pu observer la désorganisation de la structure nucléaire du noyau reproductif. Il a été observé qu'au fur et à mesure que les doses d'irraditaion augmentent, il en est de même pour le nombre de graines anormales. Le sauvetage *in vitro* des embryons issus de graines sans endospermes a permis d'obtenir de nombreuses plantes. Deux d'entre elles présentaient un nombre anormal de chromosomes ($9 < n < 13$). Néanmoins ces plantes n'ont pas survécues. L'analyse biochimique par électrophorèse d'iso-enzymes (MDH, PRX) des 188 plantes obtenues à partir de graines sans endospermes n'a pas permis de révéler la présence de plantes homozygotes. Toutes les plantes obtenues sont hétérozygotes pour un nombre variable de locci. Les zymogrammes ont permis d'observer une hétérozygotie différentes selon les croisements effectués.

Ginogénesis inducida con polen irradiado en banano *Musa acuminata* C.

Jean-Vincent Escalant, Humberto Leblanc, Jose Luis Moreno.

CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

En el marco del mejoramiento genético de los bananos y plátanos, la obtención de plantas homocigotas a partir de los diploides silvestres es de mucha importancia. El cultivo de tejidos y los haplométodos deberían permitir más rápidamente la obtención de dichas plantas. La ginogénesis inducida con polen irradiado de *Musa balbisiana* type TANI y de pollen de las especies ornamentales *Musa ornata* y *Musa becarii* ha sido estudiada sobre las subespecies *Musa acuminata* ssp *burmannicoïdes* y *Musa acuminata* ssp *malaccensis*. El polen conserva más de 50% de su capacidad de germinación aun después de una irradiación de 1000 gray. El tubo germinativo crece y puede alcanzar el óvulo a cualquiera de las dosis de irradiación utilizada. En el caso del polen irradiado se demostró la desorganización de la estructura nuclear del núcleo reproductivo. Conforme aumenta la dosis de irradiación utilizada, se incrementa le porcentaje de semillas anormales. El rescate *in vitro* de los embriones procedentes de semillas sin endospermo permitió obtener numerosas plantas. Dos de ellas presentaban un número cromosómico anormal ($9 < n < 13$). Sin embargo estas plantas no lograron desarrollarse y se perdieron. El análisis bioquímico por electroforesis de iso-enzimas de las 188 plantas obtenidas no permitió resaltar la presencia de plantas homocigotas. Todas la plantas son heterocigotas por un número variable de locci. Los zimogramas permiten resaltar una heterocigocía diferente dependiendo del cruce realizado.

Anther culture for rice improvement at CIRAD-CA.

D. Filloux ¹, B. Courtois ², E. Guiderdoni ³

¹. CIRAD-CA, Station de Roujol, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies

². IRRI, Plant Breeding Division, PO Box 933, 1099 Manila, Philippines

³. CIRAD-CA, BIOTROP-GERDAT laboratory, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France

INTRODUCTION

In vitro androgenesis appears as a rapid way of production of pure lines from heterozygous materials. It allows fixation of progenies of a cross or recurrent population in one year whereas the traditional method of successive self-fertilizations requires three to five years. Since 1985, this technique has been carried out at the CIRAD-CA tissue culture facility in Guadeloupe (French West Indies) and at IRRI (between 1987 and 1989) for integration in its rice breeding programs. Doubled haploids (DH) lines are used directly for creation of new varieties or indirectly for molecular mapping and tagging of useful genes using isozyme or RFLP markers. DH lines are selected for irrigated rice, upland rice and mediterranean rice cultivation in different countries such as Camargue (France), West Africa, French Guyana and Brazil.

MATERIALS AND METHODS

The current scheme of DH lines production has been described by Guiderdoni *et al.* (1986 and 1991). The process leads to the development of entire plants from microspores in anthers through a two-steps technique involving callogenesis and regeneration. Chromosome doubling of haploid plants which either spontaneously occurs or is artificially mediated with an *in vivo* colchicine treatment, ensures recovery of fertile and homozygous plants. Plant material used for anther culture is mainly F1 hybrids. A goal of production of 100 DH lines per cross is attempted. Populations obtained by recurrent selection are also used for rapid production of improved lines and for evaluation of genetic gain between two cycles of recurrent selection. For the hybrid rice program, anther culture is used for fixation of traits difficult to select such as cross pollination (long stigmata) and restoration abilities.

RESULTS

Since 1985, studies have led to production of more than 5000 DH lines deriving from 75 F1 hybrids, 3 populations and 28 families. Between 5 to 10 crosses are cultured per year. *Japonica* genotypes were found to be more adapted than *indica* and temperate *japonica* varieties are more responsive than tropical upland *japonicas*. Average production ranges from 1 to 5 DH lines per 100 cultured anthers but some materials remain nearly totally unresponsive. Spontaneous doubled haploid frequency ranges from 30 to 60 % of the regenerated plants.

However, a widespread utilization of the technique is still hampered by some limitations such as strong genotype and environmental dependances, high frequency of albino plant regeneration, low efficiency of chromosome doubling treatments, frequent partial sterility of lines derived from remote hybrids.

TECHNICAL IMPROVEMENT

Researches aim at improving anther culture efficiency notably for upland *japonica* and *indica* materials.

Experiments include :

- comparative histological study of early stage of androgenesis in *japonica* and *indica* genotypes (Chair, 1991).
- growth conditions of donor plants,
- treatment of donor plants with gametocides (Beaumont and Courtois, 1990),
- relations between male sterility and androgenesis (Courtois and Taillebois, 1990),

- preplanting treatment of panicles or anthers (cold, colchicine, osmotica),
- modifying induction and regeneration medium (sugars, growth regulators, inhibitors of ethylene action),
- modifying culture conditions (anther density, size of culture vessel (Courtois, 1992)),
- early determination of ploidy level of plants or calli by flow cytometry (Filloux, unpubl.)
- increasing diploid plant obtaining by colchicine treatment of anthers (Alemanno and Guiderdoni, 1994), calli, *in vitro* plants (Filloux, unpubl.).

Prospective researches may include :

- use others diploidizing agents such as oryzalin or trifluralin less dangerous than colchicine,
- simplification of anther culture procedures using a one step culture procedure (Marassi *et al.*, 1993) or by early transfer of anthers before callusing to regeneration medium (Barloy and Beckert, 1993),
- anther culture in liquid callusing medium to improve inoculation productivity and callusing rate (CIAT method),
- plant regeneration from isolated microspores,
- understanding of genetic control of callusing and regeneration abilities using molecular markers for identifying responsive genotypes and for facilitating transfer of alleles to non-responsive materials.

VALUE AND USE OF DH LINES

The DH lines produced are evaluated in testing sites in France (Centre Français du Riz), in French Guiana, in the West African CORAF network and in Brazil. First results indicate excellent homogeneity and good agronomical value of DH lines. The absence of bias among lines generated through anther culture and lines obtained through Single Seed Descent (SSD) has been confirmed by morphologic and genetic evaluations (Courtois, 1993). The absence of bias has been confirmed among lines derived from a recurrent population (Veillet, 1993). Though a specific gametic selection during androgenesis has been demonstrated in comparing segregation of isozyme marker genes among population of DH lines and selfing (F₂) derived materials, it concerned only a small proportion of the loci and appeared neutral with regard to *indica/japonica* differentiation (Guiderdoni *et al.*, 1989). Analysis of the same materials using molecular RFLP markers confirmed these results (Mc Couch, 1990). Segregation of morphologic marker genes among DH lines deriving from *japonica/japonica* crosses did not reveal significant bias (Arnault, 1994).

Five DH lines evaluated in West Africa has been recently registred as new tropical upland *japonica* varieties. Five others DH lines derived from temperate *japonica* hybrids exploited in 1989 and evaluated in France are currently in preregistration or used as parents in new crosses. In temperate environment, time saved by anther culture reaches 4 years compared to conventional pedigree method. Some DH lines were undirectly included in the hybrid rice program for their cross pollination and restoration abilities.

Populations of DH lines deriving from distant F₁ hybrids (IR 64 x Azucena and IRAT 177 x Apura) are also being used for gene tagging and for molecular mapping, in collaboration with Cornell University, IRRI and ORSTOM. A new blast resistance gene has been located on chromosome 12 in studying cosegregation of isozyme marker genes among DH and SSD lines of the cross IRAT 177 x Apura (Abadassi *et al.*, 1991). RFLP analysis of these DH lines confirmed location of the gene called *Pi-6* (Yu *et al.*, 1993) and allowed to locate *Est-1* and *Mal-1* isozyme loci on chromosome 1 (Mc Couch, 1990). Some other genes have been recently located such as partial and total *Xanthomonas* resistance (Huang *et al.*, in press), blast resistance

Roumen and Notteghem, unpubl.), RYMV resistance (Notteghem *et al.*, unpubl.) and grain aroma (Petrov *et al.*, unpubl.). Other traits are beeing evaluated such as plant height, yield, root morphology, anoxxy and drought tolerance.

REFERENCES

- Abadassi J., Glaszmann J.C., Notteghem J.L., Guiderdoni E., Courtois B. 1991. Genetic analysis of rice blast resistance using doubled haploids, single seed descent lines, and isozyme marker genes. *In* : Rice Genetics II, Proc. Second Intl. Rice Genet. Symp. May 14-18, 1990. IRRI, Manila, Philippines, pp 746-748.
- Alemanno L., Guiderdoni E., 1994. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media. *Plant Cell Reports*, 13: 432-436.
- Arnault G., 1994. Variabilité de lignées de riz (*Oryza sativa* L.) fixées par haplodiploidisation. Mémoire de fin d'études, ESA, Angers, 87 p.
- Barloy D., Beckert M., 1993. Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33 : 45-50.
- Beaumont V., Courtois B., 1990. Comportement en androgénèse d'anthers de riz provenant de plantes traitées avec un agent chimique d'hybridation. *L'Agronomie Tropicale*, 45: 95-100.
- Chair H., 1991. Evolution anatomique comparative des cultures d'anthers de variétés *japonica* et *indica* de riz. Rapport de DEA, USTL et ENSA, Montpellier, 22 p.
- Courtois B., 1992. Influence of the type of vessel on anther culture yield. *IRRN*, 17 : 3, p 6.
- Courtois B. 1993. Comparison of single seed descent and anther culture-derived lines of three single crosses of rice. *Theor. Appl. Genet.* 85: 625-631.
- Guiderdoni E., Courtois B., Déchanet R., Feldmann P., 1986. La production de lignées haploïdes doublées de riz (*Oryza sativa* L.) par culture d'anthers *in vitro*. *L'Agronomie Tropicale*, 41: 250-257.
- Guiderdoni E., Glaszmann J.C., Courtois B., 1989. Segregation of 12 isozyme genes among doubled haploid lines derived from a *japonica* x *indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 42: 45-53.
- Guiderdoni E., Courtois B., Boissot N., Valdez M. 1991. Rice somatic tissue and anther cultures : current status in France. *In* : Biotechnology for Agriculture and Forestry. Bajaj Ed. Vol. 14. Rice, p 591-618.
- Marassi M.A., Bovo O.A., Lavia G.L., Mroginski L.A., 1993. Regeneration of rice double haploids using a one step culture procedure. *J. Plant Physiol.*, 141: 610-614.
- Mc Couch S.R., 1990. Construction and applications of a molecular linkage map of rice based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). Ph.D. thesis, Cornell University, Ithica, Ney York, 177 p.
- Veillet S. 1993. Organisation de la variabilité génétique et sélection récurrente chez le riz (*Oryza sativa* L.). Thèse de Docteur de l'Institut National Agronomique Paris Grignon, INA PG, Paris, France, 125 p.
- Yu Z.H., Mackill D.J., Bonman J.M., Mc Couch S.R., Guiderdoni E., Notteghem J.L., Tanksley S.D., 1993. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). (in press).

La culture d'anthères pour l'amélioration du riz au CIRAD-CA.

D. Filloux¹, B. Courtois², E. Guiderdoni³

¹. CIRAD-CA, Station de Roujol, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies

². IRRI, Plant Breeding Division, PO Box 933, 1099 Manila, Philippines

³. CIRAD-CA, BIOTROP-GERDAT laboratory, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France

INTRODUCTION

L'androgénèse *in vitro* apparaît comme une voie rapide de production de lignées pures à partir de matériels hétérozygotes. Elle permet la fixation de descendance d'un croisement ou d'une population récurrente en un an tandis que la méthode traditionnelle d'autofécondations successives requiert trois à cinq ans. Depuis 1985, cette technique a été mise en oeuvre au laboratoire de culture de tissus du CIRAD-CA de Guadeloupe (Antilles Françaises) et à l'IRRI (entre 1987 et 1989) pour son intégration dans ses programmes de sélection du riz. Les lignées haploïdes doublées (HD) sont employées directement pour la création de nouvelles variétés ou indirectement pour la cartographie moléculaire et l'étiquetage de gènes utiles en utilisant les marqueurs isoenzymatiques ou RFLP. Les lignées HD sont sélectionnées pour la culture des riz irrigué, pluvial et méditerranéen dans différents pays tels que la Camargue (France), l'Afrique de l'Ouest, la Guyane Française et le Brésil.

MATERIELS ET METHODES

Le schéma actuel de production des lignées HD a été décrit par Guiderdoni et al. (1986 et 1991). Le procédé conduit au développement de plantes entières à partir de microspores contenues dans des anthères par une technique en deux étapes impliquant callogénèse et régénération. Le doublement chromosomique des plantes haploïdes qui survient soit spontanément soit artificiellement au travers d'un traitement *in vivo* à la colchicine, assure le retour de la fertilité et de l'homozygotie des plantes. Le matériel végétal employé pour la culture d'anthères est essentiellement des hybrides F1. L'objectif de production de 100 lignées HD par croisement est fixé. Les populations obtenues par sélection récurrente sont aussi employées pour la production rapide de lignées améliorées et pour l'évaluation de gain génétique entre deux cycles de sélection récurrente. Pour le programme de riz hybride, la culture d'anthères est employée pour la fixation de traits difficiles à sélectionner telles que l'aptitude à la pollinisation croisée (long stigmate) et l'aptitude de restauration.

RESULTATS

Depuis 1985, les études ont conduit à une production de plus que 5000 lignées HD dérivant de 75 hybrides F1, 3 populations et 28 familles. Entre 5 à 10 croisements sont cultivés par an. Les génotypes *japonica* se trouvent plus adaptés que les *indica* et les variétés *japonica* tempérées sont plus répondeuses que les *japonica* pluviales tropicales. La production moyenne va de 1 à 5 lignées HD pour 100 anthères cultivées mais certains matériels restent presque totalement non-répondeurs. La fréquence d'haploïdes doublés spontanés varie de 30 à 60% des plantes régénérées. Cependant, une utilisation répandue de la technique est encore entravée par certaines limitations telles que les fortes dépendances du génotype et de l'environnement, la haute fréquence de plantes albinos régénérées, la faible efficacité des traitements diploïdisants, la fréquente stérilité partielle des lignées dérivées d'hybrides distants.

AMELIORATIONS TECHNIQUES

Les recherches visent à améliorer notablement l'efficacité de la culture d'anthères pour le matériel *japonica* et *indica*. Les expériences incluent :

- la comparaison histologique des stades précoces de l'androgénèse entre géotypes *japonica* et *indica* (Chair, 1991).
- les conditions de croissance des plantes mères,
- le traitement des plantes mères avec des gamétocides (Beaumont et Courtois, 1990),
- les relations entre l'androgénèse et la stérilité mâle (Courtois et Taillebois, 1990),
- prétraitement des panicules ou des anthères (froid, colchicine, osmoticum),
- la modification des milieux d'induction et de régénération (sucres, régulateurs de croissance, inhibiteurs de l'action de l'éthylène),- la modification des conditions de culture (densité d'anthères, taille du container de culture (Courtois, 1992)),
- la détermination précoce du niveau de ploïdie des plantes ou des cals par cytométrie en flux (Filloux, non pub.),
- l'augmentation de l'obtention de plantes diploïdes par traitement à la colchicine d'anthères (Alemanno et Guiderdoni, 1994), cals, plantes *in vitro* (Filloux, non pub.).

Les recherches futures devraient inclure :

- l'emploi d'autres agents diploïdisant tels que l'oryzalin ou la trifluraline moins dangereux que la colchicine,
- la simplification des procédés de culture d'anthères en utilisant une procédure en une seule étape (Marassi *et al.*, 1993) ou par transfert précoce des anthères avant apparition des cals sur milieu de régénération (Barloy et Beckert, 1993),
- la culture d'anthères en milieu liquide pour améliorer la productivité d'inoculation et le taux de callogenèse (méthode du CIAT),
- la régénération de plantes à partir de microspores isolées,
- la compréhension du contrôle génétique de l'aptitude à la callogenèse et à la régénération en utilisant des marqueurs moléculaires pour identifier les géotypes répondeurs et pour faciliter le transfert des allèles aux matériels non-répondeurs.

VALEUR ET UTILISATION DES LIGNÉES HD

Les lignées HD produites sont évaluées dans des sites de sélection en France (Centre Français du Riz), en Guyane Française, en Afrique de l'Ouest (réseau CORAF) et au Brésil. Les premiers résultats indiquent l'excellente homogénéité et la bonne valeur agronomique des lignées HD. L'absence de biais parmi des lignées générées par culture d'anthères et celles obtenues par filiation unipare (SSD) a été confirmée par des évaluations morphologiques et génétiques (Courtois, 1993). L'absence de biais a été confirmée parmi des lignées dérivées d'une population récurrente (Veillet, 1993). Bien qu'une sélection gamétique spécifique durant l'androgénèse a été démontrée en comparant la ségrégation de gènes de marqueurs isoenzymatiques parmi une population de lignées HD et de matériels en F₂, cela ne concernait seulement qu'une petite proportion de loci et paraissait neutre en regard de la différenciation *indica* / *japonica* (Guiderdoni *et al.*, 1989). L'analyse du même matériel en utilisant des marqueurs moléculaires RFLP a confirmé ces résultats (Mc Couch, 1990). La ségrégation des gènes de marqueurs morphologiques parmi des lignées HD dérivées de croisements *japonica* / *japonica* n'a pas révélé de biais significatif (Arnault, 1994).

Cinq lignées HD évaluées en Afrique de l'Ouest ont été inscrites récemment comme nouvelles variétés *japonica* tropicales pluviales. Cinq autres lignées HD dérivées d'hybrides *japonica* tempérés exploités en 1989 et évaluées en France sont actuellement en préinscription ou utilisées comme parents dans de nouveaux croisements. En conditions tempérées, l'économie de temps gagnée par la culture d'anthères est de 4 ans en comparaison de la méthode conventionnelle du pedigree. Quelques lignées HD ont été indirectement incluses dans le programme de riz hybride pour leurs aptitudes à la pollinisation croisée et de restauration.

Des populations de lignées HD dérivant d'hybrides F1 distants (IR 64 x Azucena et IRAT 177 x Apura) sont aussi employées pour la cartographie moléculaire et l'étiquetage de gènes en liaison avec l'Université de Cornell, l'IRRI et l'ORSTOM. Un nouveau gène de résistance à la pyriculariose a été situé sur le chromosome 12 en étudiant la coségrégation des gènes de marqueurs isoenzymatiques parmi des lignées HD et SSD du croisement IRAT 177 x Apura (Abadassi *et al.*, 1991). Des analyses RFLP de ces lignées HD ont confirmé la localisation du gène appelé *Pi-6* (Yu *et al.*, 1993) et a permis de situer les loci des isoenzymes *Est-1* et *Mal-1* sur le chromosome 1 (Mc Couch, 1990). D'autres gènes ont été situés récemment tels que la résistance partielle et totale au *Xanthomonas* (Huang *et al.*, sous presse), la résistance à la pyriculariose (Roumen et Notteghem, non pub.), la résistance au RYMV (Notteghem *et al.*, non pub.) et à l'arôme du grain (Petrov *et al.*, non pub.). D'autres caractères sont en cours d'évaluation telle que la hauteur de plante, le rendement, la morphologie racinaire, la tolérance à l'anoxie et à la sécheresse.

REFERENCES

- Abadassi J., Glaszmann J.C., Notteghem J.L., Guiderdoni E., Courtois B. 1991. Genetic analysis of rice blast resistance using doubled haploids, single seed descent lines, and isozyme marker genes. *In* : Rice Genetics II, Proc. Second Intl. Rice Genet. Symp. May 14-18, 1990. IRRI, Manila, Philippines, pp 746-748.
- Alemanno L., Guiderdoni E., 1994. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media. *Plant Cell Reports*, 13: 432-436.
- Arnault G., 1994. Variabilité de lignées de riz (*Oryza sativa* L.) fixées par haplodiploïdisation. Mémoire de fin d'études, ESA, Angers, 87 p.
- Barloy D., Beckert M., 1993. Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33 : 45-50.
- Beaumont V., Courtois B., 1990. Comportement en androgénèse d'anthers de riz provenant de plantes traitées avec un agent chimique d'hybridation. *L'Agronomie Tropicale*, 45: 95-100.
- Chair H., 1991. Evolution anatomique comparative des cultures d'anthers de variétés *japonica* et *indica* de riz. Rapport de DEA, USTL et ENSA, Montpellier, 22 p.
- Courtois B., 1992. Influence of the type of vessel on anther culture yield. *IRRN*, 17 : 3, p 6.
- Courtois B. 1993. Comparison of single seed descent and anther culture-derived lines of three single crosses of rice. *Theor. Appl. Genet.* 85: 625-631.
- Guiderdoni E., Courtois B., Déchanet R., Feldmann P., 1986. La production de lignées haploïdes doublées de riz (*Oryza sativa* L.) par culture d'anthers *in vitro*. *L'Agronomie Tropicale*, 41: 250-257.
- Guiderdoni E., Glaszmann J.C., Courtois B., 1989. Segregation of 12 isozyme genes among doubled haploid lines derived from a *japonica* x *indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 42: 45-53.
- Guiderdoni E., Courtois B., Boissot N., Valdez M. 1991. Rice somatic tissue and anther cultures : current status in France. *In* : Biotechnology for Agriculture and Forestry. Bajaj Ed. Vol. 14. Rice, p 591-618.
- Marassi M.A., Bovo O.A., Lavia G.L., Mroginski L.A., 1993. Regeneration of rice double haploids using a one step culture procedure. *J. Plant Physiol.*, 141: 610-614.
- Mc Couch S.R., 1990. Construction and applications of a molecular linkage map of rice based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). Ph.D. thesis, Cornell University, Ithica, Ney York, 177 p.
- Veillet S. 1993. Organisation de la variabilité génétique et sélection récurrente chez le riz (*Oryza sativa* L.). Thèse de Docteur de l'Institut National Agronomique Paris Grignon, INA PG, Paris, France, 125 p.
- Yu Z.H., Mackill D.J., Bonman J.M., Mc Couch S.R., Guiderdoni E., Notteghem J.L., Tanksley S.D., 1993. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). (sous presse).

Haplometodos : resultados recientes sobre la obtencion de plantas por cultivo de anteras de *Coffea arabica*.

Magali Dufour*, Maria del Rosario Jimenez**, Alexis Pereira**.

(*) CIRAD-CP, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

Hoy en día, las variedades cultivadas de *C. arabica* poseen una base genética estrecha. En América Latina, todas estas variedades son susceptibles a las principales enfermedades. El ciclo vegetativo del cafeto (de semilla a semilla) puede durar tres años; se evalúe generalmente una descendencia sobre un mínimo de tres cosechas (o sea tres años), y seis ciclos de retrocruces son necesarios para obtener un buen nivel de homocigocidad; en consecuencia, uno tiene que esperar cerca de treinta años para liberar una nueva variedad.

La búsqueda de plantas haploides se enmarca perfectamente en todo esquema cuyo propósito es de ampliar la base genética de los cafetos cultivados. Después de la duplicación del número cromosómico de las plantas haploides, la obtención de cafetos homocigotos permitiría, al cruzarlos, obtener poblaciones F1 homogéneas. Además, en un programa de selección genealógica, la creación de líneas sería adelantada. Finalmente, los estudios genéticos serían facilitados, como por ejemplo la detección de genes recesivos. La naturaleza anfidiplóide del cafeto nos garantiza que las plantas obtenidas por haplometodos se comportarán como verdaderos haploides, sean en realidad dihaploides.

Los trabajos de androgénesis inducida empezaron en 1973, cuando Sharp y su equipo (Sharp *et al*, 1973) obtuvieron callo diploide a partir de anteras de Bourbón amarelho y de Mundo Novo. Ningún embrión se desarrolló. En 1977, Monaco *et al* mostraron una correlación entre tres diferentes estadios de la microesporogénesis y la cantidad de callo producido por la antera cultivada. Un trabajo más reciente (Carneiro, 1993) señaló la obtención de plantas haploides en las variedades Catuaí y Catimor a partir de microesporas aisladas y de anteras. Ascanio y Arcia (1994) demostraron la importancia de un pretratamiento al frío : el porcentaje de explantes dando callos fue significativamente más alto luego de un tratamiento de 24 o 48 horas a 5°C. Embriones fueron obtenidos, entre ellos una gran proporción estaban haploides. Fueron duplicados y una centena de plantas se encuentran en el campo.

En el CATIE, los trabajos conciernan, en una primera etapa, el establecimiento y el mejoramiento de la técnica de aislamiento de microesporas de *C. arabica*, variedades Catuaí y Catimor. El mejor estadio encontrado para el cultivo fue el uninucleado tardío. La influencia de varios choques térmicos fue estudiada. Un pretratamiento de los botones florales por dos días a 4°C fue aplicado sistemáticamente antes de cultivar las anteras. Al segundo día de cultivo, la mayoría de las microesporas (cultivadas en un medio líquido simple) aumentaron su volumen de tres a cinco veces. A partir del quinto día, divisiones simétricas o asimétricas ocurren. El décimo día, pequeñas colonias se observan, con un máximo de 64 células. Parece que estas colonias quedan al interior de la pared de la microespora, la cual nunca se abre para liberarlas (Neuenschwander *et al*, 1993).

Desde hace dos años, hemos trabajado más específicamente sobre el cultivo de anteras. Trece genotipos fueron estudiados y 44,000 anteras cultivadas. Observamos una variación por la correlación entre el tamaño de los botones florales y el estadio de desarrollo de las microesporas. El estadio uninucleado mediano se encuentra en los botones de 7 mm para Caturra, 8 mm para Garnica y 8 o 9 mm para Catimor colombiana. Varios pretratamientos fueron aplicados (frío, presión osmótica, centrifugación) (Jimenez, 1995). Varios callos fueron entonces obtenidos, pero ningún se reveló embriogénico, aún que para Garnica, una reactivación del núcleo fue observada. La utilización de medios basados en los sales minerales de Murashige y Skoog no nos dio ningún resultado con respecto a la formación de callo. Al contrario, los medios basados en los sales B5 de Gamborg y complementados por AIB (2mg/l) y cinetina (0.5 o 1 mg/l) nos permitieron

obtener un mayor número de callos en Caturra y Garnica. Ciertos de estos callos tenían un aspecto parecido al del callo embriogénico clásico del cafeto. Un estudio histológico demostró que estos callos no tenían células embriogénicas. Mil de estos callos fueron transferidos a unos medios de embriogénesis somática. Tres anteras obtenidas en medios con maltosa en lugar de sacarosa produjeron seis embriones somáticos. Ellos están todavía bajo estudio para determinar su nivel de ploidia.

Literatura citada

Ascanio C., Arcia A., 1994. *Café Cacao Thé*, 38 (2) : 75-80.

Carneiro M.F., 1993. In *15° colloque Asic*, Montpellier : 133 (abstract)

Jiménez M., 1995. *Tesis de Maestría*, CATIE. 84 pp.

Monaco L.C., Söndhal M., Carvalho A., Crocomo O., Sharp W.R., 1977. In : Reinert J., Bajaj Y.P.S., eds : *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Springer Verlag : 109-129.

Neuenschwander B., Dufour M., Baumann T.W., 1993. In *15° colloque Asic*, Montpellier : 760-762.

Sharp W.R., Caldas L.S., Crocomo O.J., Monaco L.C., Carvalho A., 1973. *Phyton* 31 : 67-74.

Haplomethodes : resultats recents sur l'obtention de plantes par culture d'antheres de *Coffea arabica*.

Magali Dufour*, Maria del Rosario Jimenez**, Alexis Pereira**.

(*) CIRAD-CP, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

Les variétés actuellement cultivées de *C. arabica* possèdent une base génétique étroite. En Amérique Latine, ces variétés s'avèrent toutes sensibles aux principales maladies. Le cycle végétatif du caféier (de graine à graine) peut prendre trois ans; sachant que l'on évalue généralement une descendance sur un minimum de trois récoltes (trois ans) et que six cycles de rétrocroisements sont nécessaires pour atteindre un niveau d'homozygotie acceptable, il faut attendre environ trente ans avant de pouvoir libérer un nouvelle variété.

La recherche de plantes haploïdes s'inscrit parfaitement dans tout schéma visant à élargir la base génétique des caféiers cultivés. En effet, après duplication du stock chromosomique des haploïdes, l'obtention de caféiers homozygotes permettrait, après croisement, d'obtenir une population F1 homogène. De plus, dans un programme de sélection généalogique, la création de lignées serait accélérée. Enfin, les études génétiques seraient facilitées, comme par exemple, la détection de gènes récessifs. Le caractère amphidiploïde du caféier nous garantit que les plantes obtenues par haplomethodes se comporteront comme de véritables haploïdes, bien qu'étant en réalité des dihaploïdes.

Les travaux d'androgenèse induite sur le caféier ont commencé en 1973 quand Sharp et son équipe (Sharp *et al.*, 1973) ont obtenu du cal diploïde à partir d'antheres de Bourbon Amarelho et de Mundo Novo. Aucun embryon ne s'est développé. En 1977, Monaco *et al.* ont montré une corrélation entre trois stades différents de la microsporogenèse et la quantité de cal produit par l'anthere après mise en culture. Là encore, aucune régénération n'a été obtenue. Un travail plus récent (Carneiro, 1993) signale l'obtention de plantes haploïdes des variétés catuai et catimor à partir de microspores isolées et d'antheres. Ascanio et Arcia (1994) mettent en évidence l'importance d'un prétraitement au froid : le pourcentage d'explants callogènes est significativement plus important après un passage de 24 ou 48 heures à 5°C. Des embryons ont été obtenus, dont une grande proportion sont haploïdes. Leur stock chromosomique a été dupliqué et une centaine de plantes se trouvent actuellement au champ.

Au CATIE, les travaux ont dans un premier temps porté sur la mise au point et l'optimisation de la technique d'isolement des microspores de *C. arabica*, variétés Catuai et Catimor. Le stade retenu pour la mise en culture a été le stade uninucléé tardif. L'influence de divers chocs thermiques a été étudiée. Un prétraitement des boutons floraux pendant deux jours à 4°C s'est avéré positif et a été appliqué systématiquement avant la mise en culture des antheres. Dès le deuxième jour de culture, la plupart des microspores (cultivées dans un milieu liquide simple) subissent une augmentation de volume de trois à cinq fois. A partir du cinquième jour, des divisions, symétriques ou asymétriques ont lieu. Au dixième jour, de petites colonies sont observables, ne dépassant jamais environ 64 cellules. Il semble que ces colonies restent à l'intérieur de la paroi de la microspore qui ne se déchire jamais pour les libérer. Divers traitements osmotiques ou hormonaux ont été tentés et n'ont pas permis d'obtenir un développement ultérieur des colonies (Neuenschwander *et al.*, 1993).

Depuis les deux dernières années nous avons travaillé plus spécifiquement sur la culture d'antheres. Treize génotypes ont été étudiés et 44 000 antheres au total ont été mises en culture. Nous avons observé une variation dans la corrélation entre la taille des boutons floraux et le stade de développement des microspores. Le stade uninucléé median se rencontre dans des boutons de 7 mm pour caturra, 8 mm pour garnica et 8 ou 9 mm pour catimor colombia. Plusieurs types de prétraitements ont été appliqués (froid, pression osmotique, centrifugation) (Jiménez, 1995). Différents cals ont alors été obtenus, mais aucun ne s'est révélé être embryogène, bien que pour garnica une réactivation nucléolaire ait été observée. L'utilisation de milieux

basés sur les sels de Murashige et Skoog ne nous a donné aucun résultat sur l'induction de cal. Par contre, les milieux basés sur les sels B5 de Gamborg et additionnés d'AIB (2mg/l) et Kinétine (0.5 ou 1 mg/l) nous ont permis d'obtenir un plus grand nombre de cals sur caturra et garnica. Certains de ses cals avaient un aspect proche du cal embryogène classique du caféier. Une étude histologique a montré qu'ils ne renfermaient pas de cellules embryogènes. Un milier de cals a été transféré sur des milieux d'embryogenèse somatique. Trois anthères, obtenues sur milieux renfermant du maltose au lieu de saccharose ont donné naissance à six embryons somatiques. Ceux-ci sont actuellement à l'étude afin de déterminer leur niveau de ploïdie.

Littérature citée.

Ascanio C., Arcia A., 1994. *Café Cacao Thé*, 38 (2) : 75-80.

Carneiro M.F., 1993. In *15° colloque Asic*, Montpellier : 133 (abstract)

Jiménez M., 1995. *Tésis de Maestria*, CATIE. 84 pp.

Monaco L.C., Söndhal M., Carvalho A., Crocomo O., Sharp W.R., 1977. In : Reinert J., Bajaj Y.P.S., eds : *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Springer Verlag : 109-129.

Neuenschwander B., Dufour M., Baumann T.W., 1993. In *15° colloque Asic*, Montpellier : 760-762.

Sharp W.R., Caldas L.S., Crocomo O.J., Monaco L.C., Carvalho A., 1973. *Phyton* 31 : 67-74.

LOS SISTEMAS DE REGENERACION / LES SYSTEMES DE REGENERATION

Development of an easy *in vitro* culture system by temporary immersion

C. Teisson¹, D. Alvard¹, M. Berthouly¹, F. Côte¹, J.V. Escalant² & H. Etienne¹.

(1) CIRAD-BIOTROP, BP 5035, 34032 Montpellier, France.

(2) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

Temporary immersion is a technique known to reduce many problems involved with *in vitro* culture in liquid medium. To make this technique as cheap and easy to use as possible, simple equipment and automatic programming system have been developed. Used during successive stages of microcutting and somatic embryogenesis in different tropical species, the apparatus produced equal or better results than those obtained in semi-solid medium or in static liquid medium. Particularly somatic embryo production can be better synchronized and a large number of embryos can be obtained. Furthermore they show a closest morphology to that of zygotic embryos. Acquired advantages appear to be due to an improvement in nutrition, ventilation, gas exchanges and agitation. Best results were achieved with surprisingly short immersion frequencies and durations, which underlines the abnormal character of common culture conditions. Modification of only immersion physical parameters allows the alteration of induced biological phenomena. Its flexible use, efficiency and price should mean that this apparatus will become a standard tool for plant tissue culture, in particular for microcutting of woody species and somatic embryogenesis.

Développement d'un système simple de culture *in vitro* par immersion temporaire.

C. Teisson¹, D. Alvard¹, M. Berthouly¹, F. Côte¹, J.V. Escalant² & H. Etienne¹.

(1) CIRAD-BIOTROP, BP 5035, 34032 Montpellier, France.

(2) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

L'immersion temporaire est une technique permettant de réduire de nombreux inconvénients de la culture *in vitro* en milieu liquide. Pour pouvoir l'appliquer facilement et économiquement un appareillage et un système d'automatisation simples ont été développés. Son emploi au cours des phases successives du microbouturage ou de l'embryogénèse somatique de différentes espèces tropicales a donné des résultats égaux ou supérieurs à ceux obtenus avec un milieu semi-solide ou liquide statique. En particulier la production d'embryons somatiques est plus synchronisée et leur nombre plus élevé obtenu. Ils présentent par ailleurs une morphologie plus proche de celle des embryons zygotiques. Les améliorations de la nutrition, de l'aération et des échanges gazeux ainsi que celle de l'agitation semblent être à l'origine des avantages acquis. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des fréquences et des durées d'immersion étonnamment faibles ce qui souligne le caractère anormal des conditions usuelles de culture. La modification des seuls paramètres physiques de l'immersion permet de modifier les phénomènes biologiques induits. Sa souplesse d'emploi, son efficacité et son coût pourraient faire de ce système un outil classique en culture *in vitro* en particulier pour le microbouturage des espèces ligneuses et l'embryogénèse somatique.

Regeneration through somatic embryogenesis from male flowers of banana and plantain:

I. Amplification by temporary immersion.

Jean-Vincent Escalant¹, Carmen Bieberach², Luis E. Pocasangre³, Luis del S. Espinoza⁴, Rafael G. Kosky⁴, Juan L. Ortiz¹, Claude Teisson⁵.

(1) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica; (2) IDIAP, Panama; (3) FHIA, Honduras; (4) IBP, Cuba; (5) CIRAD-BIOTROP, Francia.

Internationally, banana and plantain are among the most important cultivated species, with a production of approximately 70 millions tons annually. The incidence of numerous diseases such as Black Sigatoka, Fusarium Wilt, viruses and nematodes affecting production, make the development of new varieties increasingly urgent.

Biotechnology as a complement breeding programmes can permit the introduction of foreign genes for resistances to diseases. The major drawback of this technique is that, it usually depends on an *in vitro* culture system like somatic embryogenesis that allows regeneration of mature plants.

Embryogenic cultures were obtained from male flowers of numerous genotypes from different groups as AAA : cv 'Grande naine', cv.'Gros Michel', cv.'Parecido al Rey', cv.'Yangambi Km5'; AAB: cv.'French plantain', cv.'Mysore'; ABB: cv.'pelipita', cv.'bluggoe'; AAAB: Bras403, FHIA01, FHIA03, FHIA23 and FHIA21. Young flowers responded after 3-4 months of culture by forming a white and yellow embryogenic callus with sometimes the development of a translucent and friable embryogenic culture composed of numerous (100-250) immature somatic embryos.

| | Yangambi Km5 | Gros Michel | Grande Naine | French plantain | Mysore | Bluggoe | Bras 403 |
|--------------------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|--------|---------|----------|
| Embryogenic clusters (%) | 5 | 4 | 9 | 7 | 3 | 6 | 0.5 |

Table 1: Embryogenic clusters obtained from male flowers of different clons of bananas.

Specially modified filter units and air-pressure system (T.I.S) allows to cultivate with temporary immersion, the embryogenic cultures for 1 minutes every 4 hours. Through this method, it is possible to multiply the initial somatic embryos population (100-250) by 100 in 2 to 3 months of culture. The somatic embryos were multiplied in cascades, by adventitious embryogenesis each one forming 4 to 5 new embryos which then separated and continued the phenomenon. Germination (70-80%) and growing were achieved by transferring the embryos in another TIS with the germination and growing medium respectively.

Regeneración por embriogénesis somática a partir de flores masculinas de banano y plátano: I. Amplificación por inmersión temporal.

Jean-Vincent Escalant¹, Carmen Bieberach², Luis E. Pocasangre³, Luis del S. Espinoza⁴, Rafael G. Kosky⁴, Juan L. Ortiz¹, Claude Teisson⁵.

(1) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica; (2) IDIAP, Panama; (3) FHIA, Honduras; (4) IBP, Cuba; (5) CIRAD-BIOTROP, Francia.

A nivel internacional, los bananos y plátanos representan una de las especies cultivadas más importantes con una producción anual de aproximadamente 70 millones de toneladas. La incidencia de numerosas enfermedades como la Sigatoka Negra, el mal de Panamá, las virosis y los nemátodos que afectan la producción, vuelve urgente la creación de nuevas variedades.

La biotecnología como complemento de los programas de selección puede permitir la introducción de genes foráneos para la resistencia a enfermedades. El principal obstáculo a esta técnica depende de un sistema potente de regeneración *in vitro* como la embriogénesis somática que permite la regeneración de plantas completas a partir de una célula.

Se pudo obtener cultivos embriogénicos a partir de flores masculinas de numerosas variedades de diferentes grupos como AAA : cv 'Grande naine', cv.'Gros Michel', cv.'Parecido al Rey', cv.'Yangambi Km5'; AAB: cv.'French plantain', cv.'Mysore'; ABB: cv.'pelipita', cv.'bluggoe'; AAAB: Bras403, FHIA01, FHIA03, FHIA23 y FHIA21. Las flores responden después de 3-4 meses de cultivo formando un callo embriogénico amarillo y blanco que presentan a veces el desarrollo de un cultivo embriogénico translucido y friable compuesto de numerosos (100-250) embriones somáticos.

| | Yangambi Km5 | Gros Michel | Grande Naine | French plantain | Mysore | Bluggoe | Bras 403 |
|-----------------------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|--------|---------|----------|
| Agregados embriogénicos (%) | 5 | 4 | 9 | 7 | 3 | 6 | 0.5 |

Table 1: Agregados embriogénicos obtenidos a partir de flores masculinas de diferentes clones de bananos.

Unidades de filtración especialmente modificadas y un sistema de aire-pulsado permiten el cultivo de los agregados embriogénicos en inmersión temporal (1 minuto cada 4 horas). De este modo es posible propagar la población inicial de embriones somáticos (100-250) con una tasa de 100 en 2 o 3 meses de cultivo. Los embriones somáticos se multiplican en cascada a través del fenómeno de embriogénesis somática adventicia, cada embrión formando 4 o 5 nuevos embriones, los cuales se separan dando continuación al proceso. La germinación (70-80%) y el crecimiento se alcanzan transfiriendo los embriones a otra unidad de inmersión (SIT) con los medios de germinación y desarrollo respectivamente.

La embriogenesis somática del café : una herramienta para el mejoramiento genético

Magali Dufour*, Alexis Pereira**

(*) CIRAD-CP, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

Las dos especies de café más cultivadas, *C. arabica* (autogamo, $2n = 4x = 44$) y *C. canephora* (allogamo, $2n = 2X = 22$), no poseen los mismos esquemas de mejoramiento genético. En ambos casos, un método de multiplicación vegetativa es deseable, con el fin de multiplicar de manera fiable las plantas híbridas sobresalientes encontradas espontáneamente o procedentes de los programas de mejoramiento genético.

La multiplicación por microestacas es una posibilidad, pero con un potencial limitado con respecto al número de plantas producidas y con un precio alto. Desde hace varios años, las investigaciones se orientaron así a la embriogénesis somática. Esta técnica consiste en obtener estructuras embrionarias cuales no proceden de fecundación, si no que son producidas en los tejidos somáticos de una planta madre, directamente, or por medio de un callo. Este fenómeno

recurre a la totipotencialidad de las células vegetales y ha sido estudiado por varios años en el café (Staritsky, 1970). Sin embargo, la técnica no es bien desarrollada como para ser utilizada por los productores.

Con el propósito de tener acceso a las técnicas modernas de ingeniería genética, es necesario disponer de un método de regeneración tal como la embriogénesis somática. Es posible obtener embriones somáticos de café a partir de varios explantes : fragmentos de tallo (Staritsky, 1970; Dublin, 1980), hojas (Hermann y Hass 1975; Söndhal y Sharp, 1977; Dublin, 1981; Pierson *et al*, 1983; Yasuda *et al*, 1985), anteras (Sharp *et al*, 1973) e óvulos (Lanaud, 1981).

Los autores enfocan usualmente en dos técnicas : sea obtienen directamente los embriones somáticos en un solo medio de cultivo (Dublin, 1981; Yasuda *et al*, 1985), sea utilizan una secuencia de dos etapas (Pierson *et al*, 1983; Dublin, 1984). En el primer caso existe un fuerte efecto del genotipo, o sea todos los genotipos no dan la misma respuesta (Bieysse *et al*, 1993; Ramos *et al*, 1993). En relación a la doble secuencia, Michaux-Ferrière *et al* (1987) demostraron que la primera etapa corresponde a la inducción de células embriogénicas dentro de un callo procedente de células perivasculares, y que la segunda etapa es la simple evolución de las células embriogénicas en embriones.

La utilización de una secuencia de dos medios permitió al equipo de Söndhal (Söndhal y Sharp, 1977; Söndhal *et al*, 1979) encontrar dos olas de formación de embriones somáticos. La primera (LFSE - Low Frequency Somatic Embryogenesis) no permite la obtención de un gran número de embriones. La segunda, llamada HFSE (High Frequency Somatic Embryogenesis) produce un número mayor de proembriones organizados en pequeños montones al interior de un callo friable, el cual se puede cultivar en medio líquido. Neuenschwander y Baumann (1992) describieron un nuevo procedimiento (SCSE - Self Controlled Somatic Embryogenesis) el cual permite la obtención de un gran número de embriones somáticos normales y sincrónicos. El establecimiento de suspensiones celulares a partir de callo embriogénico (Söndhal *et al*, 1985; Zamarripa *et al*, 1991) permitió acercarse a la producción industrial, sea en bioreactores (Ducos *et al*, 1993; Noriega y Söndhal, 1993) sea en SIT (Sistema de Inmersión Temporal) desarrollado por el CIRAD (Alvard *et al*, 1993).

Por su naturaleza, la embriogenesis somática puede inducir variaciones somaclonales dentro de las plantas regeneradas (Söndhal y Lauritis, 1992).

En el CATIE, en el marco de una cooperación CIRAD/IICA-PROMECAFE/CATIE, la embriogénesis somática es usada para multiplicar a escala mediana dos plantas mades de *C. canephora* las cuales serán utilizadas en campos semilleros en varios países de America Central. Además, empezó un estudio sobre la aptitud a la embriogénesis somática de híbridos F1 de *C. arabica* entre variedades cultivadas y plantas silvestres procedentes de Etiopia. La técnica utilizada fue la de la doble secuencia según dos protocolos : lo de Söndhal y Sharp (1977) y lo de Berthouly y Michaux-Ferrière (por publicar). Los resultados serán presentados; describen una heterogeneidad de respuesta entre las diferentes familias de híbridos, a nivel de la producción de callo y de embriones.

Un estudio de comparación del comportamiento al campo de plantas procedentes de embriogénesis somática y de microestacas fue empezado. A nivel del vivero, las diferencias no son visibles, pero uno debe esperar hasta las primeras cosechas para concluir sobre la variación somaclonal inducida.

Una discusión sera presentada sobre la oportunidad de un tal método para la multiplicación vegetativa.

Literatura citada

- Alvard D., Cote F., Teisson C., 1993. *Pl. Cell Tiss. Org. Cult.* 32 : 55-60
- Berthouly M., Michaux-Ferrière N., *por publicar*
- Biéysse D., Gofflot A., Michaux-Ferrière N., 1993. *Can. J. Bot.* 71 : 1496-1502
- Dublin P., 1980. *Café Cacao Thé* 24 : 281-291
- Dublin P., 1981. *Café Cacao Thé* 25 : 237-242
- Dublin P., 1984. *Café Cacao Thé* 28 : 231-244
- Ducos J.-P., Zamarripa A., Eskes A., Petiard V., 1993. In *15° colloque ASIC*, Montpellier : 89-96
- Hermann E., Hass G., 1975. *Hortscience* 10 : 588-589.
- Lanaud C., 1981. *Café Cacao Thé* 25 : 231-235
- Michaux-Ferrière N., Dublin P., Schwendiman J., 1987. *Café Cacao Thé* 31 : 103-114.
- Neuenschwander B., Baumann T., 1992. *Plant Cell Reports* 10 : 608-612.
- Noriega C., Söndhal M., 1993. In *15° colloque ASIC*, Montpellier : 73-81
- Pierson E., Van Lammeren A., Schel J., Staritzky G., 1983. *Protoplasma* 115 : 208-216
- Ramos L., Yokoo E., Gonçalves W., 1993. In *15° colloque ASIC*, Montpellier : 763-766.
- Sharp W., Caldas L., Crocomo O., Monaco L., Carvalho A., 1973. *Phyton* 31 : 67-74.
- Söndhal M., Sharp W., 1977. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81 : 395-408
- Söndhal M., Spahlinger D., Sharp W., 1979. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 94 : 101-108.
- Söndhal M., Nakamura T., Sharp W., 1985. In : Henke, Hugues, Constantin, Hollaender eds, *Tissue culture in forestry and Agriculture*, Plenum press : 215-232.
- Söndhal M., Lauritis J., 1992. In : Hammerschlag, Litz eds., *Biotechnology of perennial fruit crops*, CAB International : 401-420.
- Staritsky G., 1970. *Acta Botanica Neerlandica* 19 : 509-514
- Yasuda T., Fujii Y., Yamaguchi T., 1985. *Plant Cell Physiol.* 26 : 595-597.
- Zamarripa A., Ducos J.P., Bollon H., Dufour M., Pétiard V. 1991. *Café Cacao Thé* 35 : 233-244.

L'embryogenèse somatique du caféier, un outil pour l'amélioration génétique

Magali Dufour*, Alexis Pereira**

(*) CIRAD-CP, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

(**)CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

Les deux espèces de caféier principalement cultivées, *C. arabica* (autogamme, $2n = 4x = 44$) et *C. canephora* (allogame, $2n = 2x = 22$), ne possèdent pas les mêmes schémas d'amélioration génétique. Dans les deux cas, une méthode de multiplication végétative est désirable afin de multiplier fidèlement les plantes hybrides élités rencontrées spontanément ou issues des programmes d'amélioration génétique.

Le microbouturage est une possibilité de clonage, mais d'un potentiel limité quant au nombre de propagules produites et d'un coût relativement élevé. Les recherches se sont donc tournées depuis plusieurs années vers l'embryogenèse somatique. Cette technique consiste à obtenir des structures embryonnaires, non pas issues de fécondation, mais produites sur des tissus somatiques d'une plante-mère, directement ou par l'intermédiaire d'un cal. Il s'agit d'un phénomène faisant appel à la totipotentialité des cellules végétales et étudié depuis de nombreuses années chez le caféier (Staritsky, 1970). Toutefois la technique n'est pas encore développée au point d'être utilisable par les planteurs.

De plus dans le but d'accéder aux techniques modernes de transformation génétique, il est indispensable de disposer d'une méthode de régénération telle l'embryogenèse somatique.

Il est possible d'obtenir des embryons somatiques à partir d'explants variés : fragments de tiges (Staritsky, 1970; Dublin, 1980), feuilles (Hermann et Hass, 1975; Söndhal et Sharp, 1977; Dublin, 1981; Pierson *et al*, 1983; Yasuda *et al*, 1985), anthères (Sharp *et al*, 1973) et ovules (Lanaud, 1981).

Les auteurs utilisent classiquement deux approches : soit ils obtiennent directement les embryons somatiques sur un seul milieu de culture (Dublin, 1981; Yasuda *et al*, 1985), soit ils emploient une séquence de deux étapes (Pierson *et al*, 1983; Dublin, 1984). Dans le premier cas, un fort effet génotype se fait sentir, tous les génotypes ne répondant pas de la même façon (Bieysse *et al*, 1993; Ramos *et al*, 1993). En ce qui concerne la double séquence, Michaux-Ferrière *et al* (1987) ont démontré que la première étape correspond à l'induction de cellules embryogènes à l'intérieur d'un cal provenant de cellules perivasculaires, et que la deuxième étape est la simple évolution des cellules embryogènes en embryons.

L'utilisation d'une séquence de deux milieux a permis à l'équipe de Söndhal (Söndhal et Sharp 1977; Söndhal *et al*, 1979) de mettre en évidence deux vagues de formation d'embryons somatiques. La plus précoce (LFSE - Low Frequency Somatic Embryogenesis) ne permet l'obtention que d'un nombre réduit d'embryons. La seconde vague, appelée HFSE (High Frequency Somatic Embryogenesis) produit un plus grand nombre de proembryons organisés en petits amas au sein d'un cal friable pouvant être cultivé en milieu liquide. Neuenschwander et Baumann (1992) ont décrit un nouveau procédé (SCSE-Self Controlled Somatic Embryogenesis) permettant l'obtention d'un grand nombre d'embryons somatiques bien formés et synchrones. L'établissement de suspensions cellulaires à partir de cals embryogènes (Söndhal *et al*, 1985; Zamarripa *et al*, 1991) a permis d'approcher la production industrielle, soit en bioreacteurs (Ducos *et al*, 1993; Noriega et Söndhal, 1993), soit en SIT (Système d'Immersion Temporaire), développé par le CIRAD (Alvard *et al*, 1993).

L'embryogenèse somatique, de par sa nature, peut induire des variations somaclonales parmi les plantes régénérées (Söndhal et Lauritis, 1992).

Au CATIE, dans le cadre d'une coopération CIRAD/IICA-PROMECAFE/CATIE, l'embryogenèse somatique est utilisée pour multiplier à moyenne échelle deux plantes-mères de *C. canephora* qui seront

utilisées en champs semenciers dans plusieurs pays d'Amérique Centrale. De plus, une étude est menée sur l'aptitude à l'embryogenèse somatique de *C. arabica* hybrides F1 entre des variétés cultivées et des caféiers sauvages issus de prospections en Ethiopie. La technique utilisée a été celle de la double séquence, selon deux protocoles, celui de Söndhal et Sharp (1977) et celui de Berthouly et Michaux-Ferrière (soumis à publication). Les résultats qui vont être présentés décrivent une hétérogénéité de réponse entre les différentes familles d'hybrides, tant au niveau de la production de cal que d'embryons.

Une étude de comparaison du comportement au champ de plantes issues d'embryogenèse somatique et de microbouturage est en cours. Au niveau de la pépinière, les différences ne sont pas visibles, mais il faudra attendre les premières récoltes pour conclure sur la variation somaclonale pouvant être induite.

Une discussion sera présentée sur l'opportunité d'une telle méthode pour la multiplication végétative.

Littérature citée

- Alvard D., Cote F., Teisson C., 1993. *Pl. Cell Tiss. Org. Cult.* 32 : 55-60
- Berthouly M., Michaux-Ferrière N., *soumis pour publication*
- Bieysse D., Gofflot A., Michaux-Ferrière N., 1993. *Can. J. Bot.* 71 : 1496-1502
- Dublin P., 1980. *Café Cacao Thé* 24 : 281-291
- Dublin P., 1981. *Café Cacao Thé* 25 : 237-242
- Dublin P., 1984. *Café Cacao Thé* 28 : 231-244
- Ducos J.-P., Zamarripa A., Eskes A., Petiard V., 1993. In *15° colloque ASIC*, Montpellier : 89-96
- Hermann E., Hass G., 1975. *Hortscience* 10 : 588-589.
- Lanaud C., 1981. *Café Cacao Thé* 25 : 231-235
- Michaux-Ferrière N., Dublin P., Schwendiman J., 1987. *Café Cacao Thé* 31 : 103-114.
- Neuenschwander B., Baumann T., 1992. *Plant Cell Reports* 10 : 608-612.
- Noriega C., Söndhal M., 1993. In *15° colloque ASIC*, Montpellier : 73-81
- Pierson E., Van Lammeren A., Schel J., Staritzky G., 1983. *Protoplasma* 115 : 208-216
- Ramos L., Yokoo E., Gonçalves W., 1993. In *15° colloque ASIC*, Montpellier : 763-766.
- Sharp W., Caldas L., Crocomo O., Monaco L., Carvalho A., 1973. *Phyton* 31 : 67-74.
- Söndhal M., Sharp W., 1977. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81 : 395-408
- Söndhal M., Spahlinger D., Sharp W., 1979. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 94 : 101-108.
- Söndhal M., Nakamura T., Sharp W., 1985. In : Henke, Hugues, Constantin, Hollaender eds, *Tissue culture in forestry and Agriculture*, Plenum press : 215-232.
- Söndhal M., Lauritis J., 1992. In : Hammerschlag, Litz eds., *Biotechnology of perennial fruit crops*, CAB International : 401-420.
- Staritzky G., 1970. *Acta Botanica Neerlandica* 19 : 509-514
- Yasuda T., Fujii Y., Yamaguchi T., 1985. *Plant Cell Physiol.* 26 : 595-597.
- Zamarripa A., Ducos J.P., Bollon H., Dufour M., Pétiard V. 1991. *Café Cacao Thé* 35 : 233-244.

Regeneration through somatic embryogenesis from male flowers of banana and plantain: II. Cell suspensions.

Côte FX*, Grapin A*, Rabot B**, Domergue R*, Monmarson S*, Lambert J*, Teisson C*.

(*) CIRAD-FLHOR, Laboratoire BIOTROP BP 5035 34032 Montpellier Cedex 01. Fax 33-67 61 57 92 E-Mail cote@cirad.fr

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica, Fax 506-5561533, E-mail: brabot@catie.ac.cr

A method of banana plant regeneration through embryogenic cell suspension, inspired by the model described by the professor MA, has been developed from the culture of male flowers. This method is made up of five steps: 1) The male flowers put on a medium supplemented with 2,4-D (4 mg/l) form a friable callus which carries many embryos, 2) these callus put on shaken liquid medium release pro-embryogenic masses (PEM), which multiply and maintain the cell suspension, 3) When put on a semi-solid medium without 2,4-D but supplied with auxins and cytokinins the PEM develop into embryos, 4) the embryos formed germinate on a medium supplemented with auxins and cytokinins, 5) the settling step on a medium without plant hormones permits the development of plantlets which are ready to be transferred *in vivo*.

This system was developed successfully with two cultivars of agronomical interest belonging to the genomic groups AAA (cv Grande Naine) and AAB (cv French sombre). For each of these cultivars the successfully repetition of the method was checked by initiating suspensions from callus stemming from various plants. The system was also developed with one diploid cultivar (selection IRFA 903).

The features of the different steps are similar whatever the cultivar is, and they are the following: 1) percentage of friable callus obtained is about 5 per hundred cultivated male buds, 2) the growth of the suspension, which is calculated by the sedimented cell volume (SCV) augmentation, is about 2 to 4 per month, 3) the spreading of one ml of cell volume on semi-solid medium allows the formation of 10^5 to $3 \cdot 10^5$ embryos, 4) 5 to 20% of these embryos germinate and develop into plantlets. The performances achieved by this system are comparable to those obtained with model species like carrot or coffee tree.

At the histological level, the feature of this regeneration system consists in the unicellular origin of developed embryos.

Cryoconservation of the described cell suspensions was achieved with medium supplemented with DMSO (7,5%) and saccharose (180 g/l). After the freezing in liquid nitrogen the suspensions are able again to multiple or to form embryos.

Some agronomic studies are in progress to study the conformity of the plants stemming from the described embryogenic cell suspensions.

Considering its performances, the described cell regeneration system could be used to develop new banana mass propagation methods *in vitro*. The performances of the system and the unicellular origin of the embryos make it an interesting target for developing genetic transformation methods.

Régénération par embryogenèse somatique à partir de fleurs mâles de bananiers et plantains: II. Suspensions cellulaires.

Côte FX*, Grapin A*, Rabot. B**, Domergue R*, Monmarson S*, Lambert J*, Teisson C*.

(*) CIRAD-FLHOR, Laboratoire BIOTROP BP 5035 34032 Montpellier Cedex 01. Fax 33-67 61 57 92
E-Mail cote@cirad.fr

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica; Fax 506-5561533, E-mail: brabot@catie.ac.cr

Une méthode de régénération des bananiers par suspensions embryogènes, s'inspirant de celle décrite par le professeur MA, a été mise au point à partir de culture de fleurs mâles. Cette méthode comprend cinq étapes: i) les fleurs mâles placées sur un milieu contenant du 2.4D (4mg l⁻¹) forment un cal friable qui portent de nombreux embryons, ii) ces calcs placés en milieu liquide agité libèrent des PEM (pro-embryogenic masses) qui se multiplient et assurent l'entretien de la suspension, système a été développé avec succès sur deux cultivars d'intérêt agronomiques appartenant aux groupes génomiques AAA (cv Grande naine) et AAB (cv French sombre). Pour chacun de ces cultivars, la répétabilité de la méthode a été vérifiée en initiant des suspensions à partir de calcs issus de différents plants. Le système a également été développé sur un cultivar diploïde (sélection IRFA 903).

Les caractéristiques des différentes phases sont voisines quelque soit le cultivar considéré et sont les suivantes: i) le pourcentage de cal friable obtenu est de l'ordre de 5 pour cent bourgeons mâles mis en culture; ii) la croissance de la suspension, calculée par l'augmentation de SCV (sedimented cell volume), est de 2 à 4 par mois, iii) l'étalement d'un ml de volume cellulaire permet la formation de 10⁵ à 3 10⁵ embryons, iv) 5 à 20 % de ces embryons germent et se développent en plantule. Les performances atteintes par ce système sont comparables à celles obtenues sur des espèces modèles comme la carotte ou le caféier.

Au niveau histologique, la caractéristique de ce système de régénération est l'origine unicellulaire des embryons formés.

La cryoconservation des suspensions cellulaires décrites a été réalisée sur des milieux enrichis en DMSO (7.5%) et en saccharose (180g/l). Après congélation dans l'azote liquide, les suspensions sont à nouveau capables de se multiplier ou de former de embryons.

Plusieurs études agronomiques sont en cours pour étudier la conformité des plants issus de suspensions cellulaires embryogènes décrites.

Compte tenu de ses performances, le système de régénération cellulaire décrit pourrait être utilisé pour développer de nouvelles méthodes de multiplication *in vitro* de masse des bananiers. Les performances de ce système et l'origine unicellulaire des embryons en font également une cible intéressante pour le développement des techniques de transformation génétique.

***Musa* embryogenic cell suspensions and its applications: recent advances**

Hilde Schoofs⁺, Bart Panis⁺, Bruno Cammue[°], László Sági⁺, Rony Swennen⁺

⁺Laboratory of Tropical Crop Husbandry, K.U. Leuven, K. Mercierlaan 92, B-3001 Heverlee, Belgium

[°]F.A Janssenslaboratory for Genetics, K.U. Leuven, W. De Croylaan 42, B-3001 Heverlee, Belgium

Establishment of embryogenic cell suspensions, using scalps: new approaches and results obtained for banana belonging to AAA, AAAh, AAB and ABB genome groups

Embryogenic cell cultures can be induced from scalp explants, which are prepared from *in vitro* proliferating shoot-tips. It was proven that the proliferation quality of the explant is of great importance. Most cultivars need a preculture on a proliferation medium with high cytokinin content, in order to obtain a proliferation quality comparable to that of the modelplant 'Bluggoe', showing compact, white meristematic shoots with a minimum of leaf material present.

On scalps induced on semid-solid medium, somatic embryos and embryogenic calluses could appear on meristematic globules after 6-16 weeks of culture. Frequencies of embryogenic callus formation ranged from 5-25%. Calluses could be maintained and multiplied on semi-solid medium for several months before transfer to liquid medium.

Embryogenic calluses were often very heterogenous, bearing both very young and more developed somatic embryos. For 'Three Hand Planty' ideal homogenous calluses were obtained.

When calluses were transferred to liquid medium, embryogenic cell suspensions could be rapidly obtained. In that way, embryogenic cell cultures were produced for 'Three Hand Planty' (AAB), 'Agbagba' (AAB) and 'Williams' (AAA). Plants could be regenerated, either directly from embryos on the calluses, or indirectly from embryogenic cell suspensions. Plants were evaluated in the greenhouse and no plant abnormalities were found.

Isolated somatic embryos were found on scalps of 'Igitsiri' (AAAh), 'Nakitengwa' (AAAh), 'Prata' (AAB) and 'Cavendish 901' (AAA).

Meristematic globules produced by the scalp, which in the beginning show a 3 layer configuration and do not contain any embryogenic cells, can be transformed into embryogenic cell producing structures by an unknown trigger. Yet more cultivars could reach this stage on semi-solid medium than was the case for culturing in liquid medium.

In conclusion, scalps seem to be a promising explant for the induction of embryogenic cell cultures. Cultivars belonging to different genome groups, can produce embryogenic calluses, which once transferred to liquid medium result in embryogenic cell suspensions. Especially cultivars prone to attack by Black Sigatoka and *Fusarium* wilt, will be envisaged since at K.U. Leuven genes coding for proteins inhibiting growth of these fungal pathogens, have been isolated from plants.

Cryopreservation of banana germplasm

Methods for the cryopreservation or freeze-storage of banana were developed at the Laboratory of Tropical Crop Husbandry for two tissue culture types, i.e. embryogenic cell suspension cultures and *in vitro* proliferating meristems.

The safe, long term preservation of embryogenic cell suspensions is of outermost importance since the initiation of these cultures is labour intensive and sometimes difficult for every cultivar, embryogenicity can be lost and contaminations may occur during subculturing. Moreover, this material has proved to be the material of choice for the isolation of regenerable protoplasts and genetic transformation using particle

bombardment. The optimised method involves cryoprotection with 7.5 % DMSO (dimethyl sulfoxide) and slow freezing (1°C/min) and could be applied to suspensions cultures of cultivars belonging to different groups, provided they contain a high amount of non-organised embryogenic cell clumps. Organised structures like proembryos, and cells containing large vacuoles and starch grains are recalcitrant towards this cryopreservation method. To obtain survival of organised structures inside the suspensions, a treatment with highly concentrated plant vitrification solutions followed by rapid freezingeing was tested. Post-thaw survival was limited due to the toxicity of this solution and osmotic injury.

Genetic transformation of *Musa*

The established embryogenic cell suspensions proved to be suitable for the introduction of foreign genes by particle bombardment. A modified particle gun was used to optimize bombardment conditions which resulted in high transient expression of the *gus A* reporter gene in both banana and plantain cells. The optimized conditions were used to compare transient gene expression of different chimaeric promoter-*gus A* constructs both in embryogenic cell suspensions and protoplasts isolated therefrom. In both cell types highest gene expression was found with the maize polyubiquitin promoter sequences. The developed protocol also allowed the production of transgenic banana plants. Phenotypic and molecular characterization of transformed plants demonstrated stable integration of the genes into the banana genome.

Rice cell suspension and protoplast cultures

E. Guiderdoni, N. Michaux Ferrière, S. Pichot, N. Mezencev, D. Ferrand, H. Chair, T. Cauchy et G. Clément.

CIRAD-CA, Rice Biotechnology Project, BP5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France.

In rice, immature and mature zygotic embryos and microspores are the most widely used tissues for inducing embryogenic calluses which can be used for establishing embryogenic cell suspensions which in turn will be used for isolating protoplasts able to regenerate plants. Epithelial and subepithelial scutellum cells of the embryo, homogeneous cell clumps grown in suspension, preparations of isolated protoplasts and microspores are suitable targets for transformation through various techniques. We will present here our experience in analyzing embryogenesis from these cultured cells, establishing cell suspensions, isolating and culturing protoplasts and evaluating plants regenerated from protoplasts.

Embryogenic cell suspensions have been established mainly on AA cell culture medium (Muller and Gräfe 1978) either from microspore calluses, induced on a N6-based culture medium (Chu 1978) or from immature embryo calluses induced on a CC-based culture medium (Potrykus et al 1979) in various temperate japonica rice varieties. Establishment of homogeneous cell suspensions requires a 3 to 4 month time span. Cell suspensions derived from calluses of germinal origin were generally haploid whereas suspensions of somatic origin were diploid (Guiderdoni and Chair 1992, Cauchy et al 1995). Growth curve analysis of the packed cell volume of the cell cultures over 13 days showed occurrence of a 2-fold increase in 6-7 days, but this ratio was found to vary according to the density of the inoculum. At this stage the cell suspensions consist of homogeneous and unorganized small cell aggregates. Purified cell suspension protoplasts were cultured on a N6-based medium on top of Durapore filters plated on nurse cell cultures (of rice or *Lolium multiflorum*), which were maintained for 2 to 3 weeks (Guiderdoni and Chair 1992). Frequency of formation of embryogenic protoplast-derived calluses, after five to six weeks of culture, ranged from 10^{-3} to 10^{-2} according to the genotype. The protocalluses were directly transferred to a MS-based regeneration medium (Murashige et Skoog 1962). The various varieties tested have exhibited a range of response to the technique namely in frequency of plant regeneration and frequency of formation of albino plants (Table 1). Frequency of albino plants was generally higher when microspore calluses have been used for initiating the cell suspension.

Microspore callus-derived protoplasts generated plants exhibiting ploidy levels ranging from n to 6n including 50 to 60% diploid plants whereas 75% of plants regenerated from embryo callus-derived protoplasts kept their original ploidy level (Table 2) (Cauchy et al 1995). Change of ploidy level are likely due to spontaneous polyploidization of the protoplast genome during the early phases of culture since we have shown that multinucleated, fusioned protoplasts found at isolation exhibited poor viability.

Field evaluations of progenies of 110 and 75 diploid plants derived from protoplasts of variety Miara (Mezencev et al 1995) and Ariete (Cauchy et al 1995) respectively have demonstrated occurrence of significant changes for agronomical characters. The frequency, direction and range of variation appeared genotype-dependent. These variations, apparently fixed, may have in some cases an agronomical interest. Results of these studies will be commented.

References:

- Chu CC (1978) In: Proc Symp Plant Tissue Cult, Science Press, Beijing, pp43-55
- Cauchy T, Pichot S, Chair H, Clément G, Guiderdoni E (1995) Poster présenté au 3ème symposium intl sur la génétique du riz, IRRI, Manila, Philippines, 15-20 Oct 1995.
- Guiderdoni E, Chair H (1992) Plant Cell Rep 11:618-622
- Mezencev N, Clément G, Guiderdoni E (1995) Plant Breed 114:149-154
- Muller AJ, Gräfe R (1978) Mol Gen Genet, 161:67-76

Murashige et Skoog (1962) *Physiol Plant* 15: 473-497

Potrykus I, Harms CT, Lörz H (1979) *Theor Appl Genet*, 54:209-214

| Genotype | Ploidy level | Nb of experiment sb | Nb of protocalluses transferred | Frequency of calluses regenerating green plants | Frequency of calluses regenerating albino plants |
|---------------------|--------------|---------------------|---------------------------------|---|--|
| Taipei 309 | 2n | 1 | 90 | 46.6 | 2.3 |
| Thaibonnet | 2n | 2 | 407 | 45.5 | 10.2 |
| Miara | n | 6 | 1578 | 48.0 | 15.1 |
| Ariete ^a | n | 2 | 1910 | 6.9 | 36.3 |
| | n | 1 | 140 | 7.9 | 47.1 |
| IRAT 177 | n | 2 | 160 | 15.0 | 5.9 |
| Pygmalion | n | 1 | 135 | 16.2 | 9.6 |
| Delta | n+2n | 4 | 710 | 17.3 | 2.1 |

^a: two different cell suspensions used

Table 1: Results of culture of haploid or diploid cell suspension-derived protoplasts of seven rice varieties (1991-1994). A mean of one million protoplasts have been cultured per experiment.

| Genotype | Cell suspension | Ploidy of protoplasts at isolation | Nb of plants analyzed | Frequency of plants exhibiting a ploidy level of | | | | | |
|------------|------------------|------------------------------------|-----------------------|--|------|------|------|------|------|
| | | | | n | 2n | 3n | 4n | 5n | ≥6n |
| Miara | M1 ^a | n | 422 | 2.1 | 59.9 | 12.6 | 24.4 | 0.9 | 0 |
| | M2 | n | 65 | 1.5 | 60.2 | 21.5 | 13.8 | 0 | 3.0 |
| | M3 | n+2n | 75 | 0 | 10.7 | 1.3 | 24.0 | 12.0 | 52.0 |
| Ariete | A4 ^b | n | 59 | 1.7 | 50.9 | 13.5 | 30.5 | 3.4 | 0 |
| | A4 ^b | n | 113 | 2.5 | 59.5 | 17.1 | 14.4 | 1.0 | 5.5 |
| | A6 | n | 57 | 1.8 | 43.8 | 3.5 | 38.6 | 5.3 | 7.0 |
| | A7 | n+2n | 60 | 10.0 | 15.0 | 1.7 | 28.3 | 1.7 | 43.3 |
| Thaibonnet | TB1 ^c | 2n | 74 | 0 | 74.3 | 2.7 | 18.9 | 1.4 | 2.7 |

^a: mean data from 4 separate experiments (from Guiderdoni and Chair 1992) ^b: results of two experiments carried out 4 and 10 months after cell suspension initiation. ^c: scutellum callus-derived cell suspension.

Table 2: Ploidy of plants regenerated from haploid or diploid protoplasts of 3 rice varieties.

Culture de suspensions cellulaires et de protoplastes de riz

E. Guiderdoni, N. Michaux Ferrière, S. Pichot, N. Mezencev, D. Ferrand, H. Chaïr, T. Cauchy et G. Clément

CIRAD-CA, projet Biotechnologies du Riz, BP5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

Chez le riz, les embryons zygotiques matures ou immatures et les microspores contenues dans les anthères sont les explants les plus utilisés pour former des cals qui peuvent servir à l'établissement de suspensions cellulaires embryogènes qui à leur tour pourront être utilisées pour libérer des protoplastes aptes à la régénération de plantes. Les cellules épithéliales et subépithéliales du scutellum de l'embryon, les agrégats cellulaires en suspension, et les préparations de protoplastes voire les isolements de microspores sont des cibles cellulaires pour une transformation par diverses méthodes. Nous décrivons ici notre expérience de l'analyse de l'embryogenèse à partir de ces cellules cultivées *in vitro*, de l'établissement des suspensions cellulaires, de l'isolement et de la culture des protoplastes et de l'analyse des plantes néoformées à partir de ces derniers.

Des suspensions cellulaires ont été établies principalement sur un milieu AA (Muller et Gräfe 1978) à partir de cals de microspores obtenus sur un milieu de base N6 (Chu 1978) ou de cals d'embryons immatures induits sur un milieu de base CC (Potrykus et al 1979) de diverses variétés japonica tempérées de riz. L'établissement des suspensions demande entre 3 et 4 mois. Les suspensions établies issues de cals d'origine germinale sont en général haploïdes tandis que les suspensions issues de cals somatiques sont diploïdes (Guiderdoni et Chaïr 1992, Cauchy et al 1995). L'observation de la cinétique de la croissance du volume cellulaire des suspensions montre que celui-ci est multiplié par plus de deux en 6-7 jours, mais ce ratio varie en fonction de la densité de l'inoculum. Les suspensions sont à ce stade constituées d'amas uniformes et inorganisés de petites cellules. Les protoplastes isolés de ces suspensions sont cultivés après purification sur un milieu de base N6 à la surface de membranes Durapore déposées sur une inclusion de cellules nourrices (riz ou *Lolium multiflorum*) dont la présence est maintenue entre 2 et 3 semaines (Guiderdoni et Chaïr 1992). Les cals compacts embryogènes individualisés, formés en 5-6 semaines avec une fréquence comprise entre 10^{-3} et 10^{-2} suivant le génotype, sont transférés directement sur un milieu de régénération de base MS (Murashige et Skoog 1962). Les différentes variétés testées ont montré des différences dans la fréquence de régénération de ces cals et d'autre part dans la fréquence de formation de plantes albina (Tableau 1). Cette dernière est en général plus importante lorsque des cals de microspores ont été utilisés pour initier la suspension cellulaire.

Les plantes issues de protoplastes haploïdes présentent des niveaux de ploïdie variant de n à $6n$ avec environ 50 à 60% de plantes diploïdes tandis que 75% des plantes issues de protoplastes diploïdes conservent leur niveau de ploïdie d'origine (Tableau 2) (Cauchy et al 1995). Ces changements de niveau de ploïdie sont sans doute dus à une polyploïdisation spontanée des protoplastes dans les phases précoces de leur culture puisqu'il a été montré que les protoplastes multinucléés issus de fusion sont non viables dès l'isolement.

L'évaluation au champ des descendance de 110 et 75 plantes diploïdes issues respectivement de protoplastes des variétés Miara (Mezencev et al 1995) et Ariete (Cauchy et al 1995) a montré l'existence de variations significatives dont la fréquence, la direction et l'amplitude sont dépendantes du génotype. Ces variations, fixées, peuvent avoir dans de rares cas un intérêt agronomique. Les résultats de ces études seront commentés.

Références:

Chu CC (1978) In: Proc Symp Plant Tissue Cult, Science Press, Beijing, pp43-55

Cauchy T, Pichot S, Chaïr H, Clément G, Guiderdoni E (1995) Poster présenté au 3ème symposium intl sur la génétique du riz, IRRI, Manila, Philippines, 15-20 Oct 1995.

Guiderdoni E, Chaïr H (1992) Plant Cell Rep 11:618-622

Mezencev N, Clément G, Guiderdoni E (1995) Plant Breed 114:149-154

Muller AJ, Gräfe R (1978) Mol Gen Genet, 161:67-76
 Murashige et Skoog (1962) Physiol Plant 15: 473-497
 Potrykus I, Harms CT, Lörz H (1979) Theor Appl Genet, 54:209-214

| Génotype | Niveau de ploïdie | Nb d'expériences | Nb protocals transférés | Fréquence de cals régénérant des plantes vertes | Fréquence de cals régénérant des plantes albina |
|---------------------|-------------------|------------------|-------------------------|---|---|
| Taipei 309 | 2n | 1 | 90 | 46,6 | 2,3 |
| Thaibonnet | 2n | 2 | 407 | 45,5 | 10,2 |
| Miara | n | 6 | 1578 | 48,0 | 15,1 |
| Ariete ^a | n | 2 | 1910 | 6,9 | 36,3 |
| | n | 1 | 140 | 7,9 | 47,1 |
| IRAT 177 | n | 2 | 160 | 15,0 | 5,9 |
| Pygmalion | n | 1 | 135 | 16,2 | 9,6 |
| Delta | n+2n | 4 | 710 | 17,3 | 2,1 |

^a:deux suspensions distinctes utilisées

Tableau 1: Résultats des cultures de protoplastes issues de suspensions cellulaires haploïdes ou diploïdes de sept variétés de riz (1991-1994). En moyenne un million de protoplastes ont été mis en culture par expérience.

| Genotype | Suspension cellulaire | Niveau de ploïdie des protoplastes à l'isolement | Nombre de plantes analysées | Fréquence de plantes présentant un niveau de ploïdie de | | | | | |
|------------|-----------------------|--|-----------------------------|---|------|------|------|------|------|
| | | | | n | 2n | 3n | 4n | 5n | ≥6n |
| Miara | M1 ^a | n | 422 | 2,1 | 59,9 | 12,6 | 24,4 | 0,9 | 0 |
| | M2 | n | 65 | 1,5 | 60,2 | 21,5 | 13,8 | 0 | 3,0 |
| | M3 | n+2n | 75 | 0 | 10,7 | 1,3 | 24,0 | 12,0 | 52,0 |
| Ariete | A4 ^b | n | 59 | 1,7 | 50,9 | 13,5 | 30,5 | 3,4 | 0 |
| | A4 ^b | n | 113 | 2,5 | 59,5 | 17,1 | 14,4 | 1,0 | 5,5 |
| | A6 | n | 57 | 1,8 | 43,8 | 3,5 | 38,6 | 5,3 | 7,0 |
| | A7 | n+2n | 60 | 10,0 | 15,0 | 1,7 | 28,3 | 1,7 | 43,3 |
| Thaibonnet | TB1 ^c | 2n | 74 | 0 | 74,3 | 2,7 | 18,9 | 1,4 | 2,7 |

^a:donnée moyenne de 4 expériences séparées (de Guiderdoni et Chair 1992) ^b:resultats de deux expériences, 4 et 10 mois après l'initiation de la suspension cellulaire. ^c:suspension issue de cals de scutellum d'embryons. Tableau 2: Ploïdie des plantes régénérées de cultures de protoplastes haploïdes ou diploïdes de trois variétésde riz.

// **La histología en apoyo al Cultivo de Tejidos**

N. Vásquez, C. Bieberach, M. Jiménez, R. Hernández y R. Vega.
CATIE, 7170, Turrialba, Costa Rica.

Introducción

El cultivo de tejidos es una técnica que permite la propagación masiva de materiales a partir de diferentes partes de la planta. No obstante, muchos de los procesos histológico involucrados en la respuesta de dichos materiales no han sido estudiados, lo que retrasa e interfiere con la adecuada interpretación de los resultados. Es por ello que en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE se realizan los correspondientes estudios histológicos de los materiales que se producen contribuyendo con una interpretación temprana y correcta.

Materiales y Métodos

Los materiales se colocan en Glutaraldehído al 2.5% en Buffer de Fosfatos durante 24 horas. Luego, se deshidratan en una serie ascendente de alcohol (50-70-80-90/95-100-100) permaneciendo una hora en cada alcohol. Seguidamente se infiltran en parafina o resina, dependiendo de los objetivos y de la naturaleza del material para luego realizar cortes a 8 o 3 um respectivamente.

Resultados

Crioconservación.

La prueba de varias tinciones para tratar de diferenciar entre embriones viables y no viables, procedentes del proceso de crioconservación, permitió establecer que la tinción de los materiales con DAPI da buenos resultados ya que los embriones viables fluorescen azul brillante, mientras que los no viables permanecen con una coloración amarilla - parduzca. Otro colorante como el DCF, utilizado normalmente para pruebas de viabilidad, no dio buenos resultados, ya que no discriminó entre material viable y no viable. Estas observaciones nos permiten entonces una prueba rápida para medir el porcentaje de viabilidad de embriones criocongelados, así como de suspensiones celulares en un tiempo muy corto.

Respuesta de callos al extracto crudo de *Mycosphaella fijiensis*

Los trabajos realizados con callos de Gran Enano y Calcuta 4 expuestos a diferentes dosis del extracto crudo de *Mycosphaerella fijiensis* permitieron determinar que con una dosis de 60 ul de extracto, se inicia el deterioro de las células de la periferia del callo en el cultivar Gran Enano. Estas muestran una maceración de las paredes celulares y en citoplasma denso de color grisáceo, 72 horas después de inoculadas. Conforme aumenta la dosis, se establece una clara delimitación entre el tejido sano y el enfermo, llegando incluso a la degradación del núcleo.

No se observaron daños estructurales en el clon Calcuta 4, para ninguna de las concentraciones probadas. Lo único que se observó fue una reacción de oxidación a las concentraciones más altas del extracto. Estos resultados nos permitieron verificar rápida y eficazmente el grado de resistencia de ambos cultivares, o sea, altamente susceptibles y altamente resistentes, prueba que podría ser aplicada con gran éxito en otros materiales.

Embriogénesis somática de Gran Enano a partir de inflorescencias masculinas.

Los cortes histológicos de manitas de banano cultivadas durante 30 días mostraron que existen diferentes respuestas al medio de cultivo. Algunos explantes iniciales entran en un proceso de envejecimiento y

presentan células con una coloración negra y ruptura de las paredes. Estas son más frecuentes en la base de la manita.

Las células que permanecen vivas acumulan almidón pero no presentan signos de división celular. Las manitas que reaccionan positivamente al medio de cultivo se caracterizan por estar en muy buen estado, además de presentar divisiones celulares frecuentes en la región de los dedos, formando callos. Así, a los dos meses de cultivo los dedos se caracterizan por la acumulación de almidón. Las células cercanas a la periferia empiezan a mostrar un cambio en la coloración del almidón pasando de violeta a pardo, que parece indicar utilización de reservas.

Esto se observa también en el callo que se formó. Algunas de éstas células se desprenden con facilidad del callo y originan células embriogénicas. Algunas de éstas se encuentran formando grupos de hasta 4 y 5 células, originando pequeños proembriones, o bien estados más diferenciados donde se pueden observar embriones en diferentes etapas de su desarrollo.

Los callos de tres meses de edad mantienen la producción de gran cantidad de células embriogénicas, además de la producción de embriones bien desarrollados formados a partir de células que se desprenden del callo inicial. Todo este proceso continúan en los callos de 4, 5 y 6 meses, donde la cantidad de embriones y células embriogénicas es aún mayor.

Cultivo de anteras de café.

Se logró determinar el tamaño más adecuado de botón floral, caracterizado por el estado de tétrada o uninucleado de sus microsporas.

Se pudo determinar además, que la desinfección de anteras utilizando hipoclorito de Calcio al 8% por 15 minutos y enjuagando 3 veces con agua destilada estéril, para ser colocadas en L-cisteína estéril fue el que permitió un mayor número de anteras con callo. Estos callos se desarrollan directamente de la pared de la antera, de la base del filamento o de las paredes internas de la antera, específicamente a partir de las capas medias.

Predominó un tipo de células de callo alargadas o redondeadas sin contenido citoplasmático. Se observó además que dependiendo de los tratamientos de desinfección así como de los pretratamientos de choque osmótico y choque térmico, varía el porcentaje de viabilidad de las microsporas, las cuales en algunos casos llegan a crecer a veces hasta 3 veces su tamaño normal y depositan gran cantidad de almidón. No se logró observar sin embargo, células embriogénicas.

Embriogénesis somática en arroz.

Se logró determinar las características histológicas de los callos de arroz provenientes de embriones inmaduros. Se observó además que 3 días después de sembrados los explantes, empieza la formación del callo, y que de 8 a 16 días después de la siembra, los callos presentan gran cantidad de regiones embrionarias, así como de muchos embriones somáticos ubicados cerca de su superficie externa. Este proceso continua hasta los 25 días, en que el callo es transferido a medio de regeneración para estimular el desarrollo de plántulas.

Cultivo de Tejidos en especies forestales.

Los segmentos de hipocotilo de *Phithecellobium saman* (Cenízaro) permitieron observar el desarrollo de gran cantidad de brotes en los extremos terminales, 25 días después de colocados en medio de cultivo.

Veinte días después de este suceso, se produce un rompimiento longitudinal de la corteza del explante con la formación posterior de células de callo a partir del cual se forman numerosos brotes apicales que pueden ser desprendidos del explante madre y crecen de manera independiente.

En el caso de los hipocotilos de *Swietenia macrophylla* (Caoba) se favoreció el desarrollo de las yemas axilares a partir de la cual se realiza exitosamente la práctica de microestacas.

Conclusiones

Todos estos estudios son de suma importancia ya que permiten establecer la secuencia de eventos en el desarrollo de los materiales a partir de cultivo de tejidos. Por otro lado, permiten corroborar y comprender mejor la respuesta de los explantes al medio de cultivo, a la desinfección o a los pretratamientos, lo que mejora las bases para el establecimiento de nuevas pruebas.

También son muy importantes en la toma de decisión sobre las pautas a seguir con los materiales durante la fase de cultivo de tejidos. iii) placés sur un milieu semi solide dépourvu de 2.4D et enrichi en auxines et cytokinines les PEM évoluent en embryons; iv) les embryons formés germent sur un milieu enrichi en cytokinine et auxines, v) la phase d 'enracinement, sur un milieu sans régulateur de croissance, conduit à des plantules prêtes a être transférées *in vivo*.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA / TRANSFORMATION GENETIQUE

Genetic transformation of banana and plantain by particle bombardment: I. Transformation of cell suspensions.

Côte FX*, Grapin A*, Legavre T*, Rabot B**, Monmarson S*, Frigout O*, Teisson C*.

(*) CIRAD-FLHOR, Laboratoire BIOTROP BP 5035 34032 Montpellier Cedex 01. Fax 33-67 61 57 92

E-Mail cote@cirad.fr

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica; fax: 506-5561533, E-mail. brabot@catie.ac.cr

Three principal research actions have been undertaken to develop a genetic transformation method of banana (*Musa* AAA cv Grande Naine, AAB cv French Sombre). They concern the study of gene transfer by biolistic, the search of promoter sequences adapted to banana transformation, the search of stable transformed plants.

- A particle gun is used for the DNA transfer, the target is made of pro-embryogenic masses (PEM) from a cell suspension in exponential growth stage. Two parameters have a mayor influence upon transient expression level (which is determined by the β -glucuronidase activity of GUS gene). Best expression levels are obtained when cell suspension growth speed is high and they are proportional to helium flow pressure. In this manner less than 100 blue points per shooting are obtained at 900 PSI but more than 1200 points are obtained at 1500 PSI. Average expression levels are higher than 1000 points per shooting (every shot is realized with 0.2 ml of suspension cell volume) and can reach more than 4000.

- Transient expression levels have been determined with cell suspensions cv French Sombre utilizing different promoter sequences upstream the GUS gene (plasmids pEMUGN/Adh1 rice promoter, pUGC1/maïs Ubiquitine promoter, pAct1D/rice actine promoter, pBI221/CaMV35S promoter, pCa2GUS/p70 promoter, pJB4/CaMV35S promoter). Histochemical and fluorimetric tests have been achieved. Highest expression levels were obtained with the plasmids pCa2GUS and pUGC1. Ubiquitine promoter sequence shows an average MUG activity of 2200 pM MU mg⁻¹ mn⁻¹. This value is respectively 3.6 and 7.7 times higher than those obtained with p70 and p35S promoter sequences. Therefore the results observed with banana plants are different from that of other Monocotyledons.

- Among the different tested selective agents hygromycin (50 mg/l) and glufosinate (12 mg/l) proved to be the most effective. Stable transformation tests were achieved with the cv Grande Naine and French Sombre using a plasmid which includes the *gus* and *bar* genes controlled by the maïs ubiquitine promoter sequences. After transformation PEM are put directly on the selective medium or after 2 months of multiplication period. Two months after the shooting, histochemical test reveals some PEM with blue colored cells. This is a sign of cellular stable transformation. Transgenic plants regeneration represents the next step in our research works.

Transformation génétique des bananiers et plantains par bombardement de particule: I: Transformation de suspensions cellulaires.

Côte FX*, Grapin A*, Legavre T*, Rabot B**, Monmarson S*, Frigout O*, Teisson C*.

(*) CIRAD-FLHOR, Laboratoire BIOTROP BP 5035 34032 Montpellier Cedex 01. Fax 33-67 61 57 92

E-Mail cote@cirad.fr

(**) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica; fax: 506-5561533, E-mail. brabot@catie.ac.cr

Trois principales actions de recherche ont été entreprises pour mettre au point une méthode de transformation génétique de bananiers (*Musa* AAA cv Grande naine, AAB cv French Sombre). Elles concernent l'étude du transfert de gènes par biolistic, la recherche de séquences promotrices adaptées à la transformation des bananiers, la recherche de transformants stables.

- un canon à particules est utilisé pour le transfert de l'ADN, la cible est constituée de PEM (pro-embryogenic masses) d'une suspension cellulaire en phase de croissance exponentielle. Deux paramètres ont une influence majeure sur le niveau d'expression transitoire (déterminé par l'activité B-glucuronidase du gène *gus*). Les niveaux d'expression les plus importants sont obtenus lorsque la vitesse de croissance de la suspension embryogène est élevée, ils sont proportionnels à la pression du flux d'hélium. On passe ainsi de moins de 100 points bleus par tir à 900 PSI à plus de 1200 points à 1500 PSI. Les niveaux moyens d'expression sont supérieures à 1000 spots par tir (chaque tir est réalisé sur 0.2ml de SCV) et peuvent atteindre plus de 4000.

- Les niveaux d'expression transitoire ont été déterminés sur des suspensions cellulaires cv French sombre en utilisant différentes séquences promotrices en amont du gène *gus* (plasmides pEMUGN, promoteur Adh1 du riz; pUGC1 promoteur Ubiquitine du maïs; pAct1D, promoteur actine du riz; pBI221 promoteur CaMv35S; pCa2GUS, promoteur P70; pJB4 promoteur CaMV35). Des tests histochimiques et fluorimétriques ont été réalisés. Les niveaux d'expression les plus élevés ont été obtenus avec les plasmides pCa2GUS et le pUGC1. La séquence promotrice de l'ubiquitine donne une moyenne d'activité MUG de 2200 pM MU mg⁻¹ mn⁻¹. Cette valeur est respectivement 3.6 et 7.7 fois supérieure à celles obtenus avec les séquences promotrices p70 et p35s. La réponse observée chez le bananier est donc différente de celles d'autres monocotylédones.

- Parmi les différents agents sélectifs testés, l'hygromycine (50 mg l⁻¹) et le glufosinate (12 mg l⁻¹) se sont révélés les plus efficaces. Des essais de transformation stable ont été réalisés sur les cultivars Grandes naine et French sombre avec un plasmide comportant les gènes *gus* et *bar* sous le contrôle de la séquence promotrice de l'ubiquitine du maïs. Après transformation, les PEM sont placés directement ou après une période de multiplication de 2 mois sur milieu de sélection. Deux mois après les tirs, des PEM présentent, après test histochimique, des cellules avec une coloration bleue. Ceci est le signe d'une transformation stable de cellules. La régénération de plantes transgéniques est la prochaine étape des travaux entrepris.

Genetic transformation of banana and plantain by particle bombardment: II. Transformation of somatic embryos.

Jean-Vincent Escalant¹, Thierry Legavre², Juan L. Ortiz¹, Claude Teisson²

(1) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

(2) CIRAD-BIOTROP, Montpellier, Francia.

Genetic transformation was done using Biolistic techniques (helium-driver particle gun and microprojectiles). The target consist in the adventitious somatic embryos obtained from male flowers embryogenic cultures in temporary immersion system at an early stage of the exponential growth stage.

Parameters which can be varied to optimise the bombardment system are numerous: acceleration force, target distance, vacuum conditions and promoters. In CATIE, best transient expression of β -glucuronidase gene (GUS) was obtained in both cultivars 'Grande Naine' and 'Gros Michel' using the enhanced 35S promoter (pCaMV2) in comparison with ubiquitin (pUGC1) and Actin (p0021). We recorded scores of 400 to 800 blue spots per shooting.

Stable expression was achieved 5 weeks after transformation using the GUS gene with the cultivars 'Grande Naine' and 'Gros Michel'.

To select transformed cells, we used the pBar gene and the selective herbicide agent Glufosinate or 'BASTA'. 15 days after transformation, somatic embryos were subjected to selection in BASTA 5mg/l for two months in the SIT system. Subsequently, they were regenerated on a semi-solid germination medium containing BASTA 5 mg/l. Only 0.25% of the embryos allowed the formation of plants. These plants are currently under acclimatisation for further DNA analysis.

Transformación genética de banano y plátano por acelerador de partículas: II. Transformación de embriones somáticos.

Jean-Vincent Escalant¹, Thierry Legavre², Juan L. Ortiz¹, Claude Teisson²

(1) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.

(2) CIRAD-BIOTROP, Montpellier, Francia.

La transformación genética se realiza usando técnicas de biolística (acelerador de partículas a Helium y microproyectiles). El blanco consiste en los embriones somáticos adventicios procedentes de los cultivos embrionarios de flores masculinas obtenidos en inmersión temporal a un estado temprano del crecimiento exponencial.

Los parámetros que pueden variar para optimizar el sistema de bombardeo son numerosos: fuerza de aceleración, distancia del blanco, condiciones de vacío y promotores. En CATIE, los mejores resultados de expresión transitoria del gen de la β -glucuronidasa (GUS) se obtuvieron en ambos cultivares 'Grande Naine' y 'Gros Michel' utilizando el promotor 35S aumentado (pCaMV2) en comparación con los de la Ubiquitina (pUGC1) y de la Actina (p0021). Se pudo obtener entre 400 y 800 puntos azules por tiro. Se logró obtener una expresión estable del gen GUS 5 semanas después de la transformación en los cultivares 'Grande Naine' y 'Gros Michel'.

Para seleccionar células transformadas, utilizamos el gen pBar y el compuesto herbicida selectivo Glufosinate o 'BASTA'. 15 días después de la transformación, los embriones somáticos se sometieron a una selección con BASTA 5mg/l durante 2 meses en el sistema de inmersión temporal. Entonces los embriones se ponen en regeneración sobre un medio semi-sólido de germinación con BASTA 5mg/l. Solamente 0.25% de estos embriones logran formar una planta completa. Estas plantas se encuentran actualmente en una fase de aclimatación previa al análisis del DNA.

Transformation of rice through Polyethylene glycol treatment of protoplasts and microprojectile bombardment on scutellum of immature embryos

H. Chair, F. Georget, V. Cancade, T. Legavre, N. Michaux Ferrière et E. Guiderdoni
CIRAD-CA, Rice Biotechnology Project, BP5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

Rice is the only cereal where transgenic plants have been repeatedly and efficiently obtained using three transformation techniques: direct gene transfer through physical (electroporation)(Shimamoto et al 1989) or chemical (Polyethylene glycol:PEG)(Zhang and Wu 1988) treatment of protoplasts, microprojectile bombardment on cell suspensions (Cao et al 1992), embryo scutellum (Christou et al 1991) and scutellar callus (Li et al 1993), and recently, transfection of young scutellar callus by *Agrobacterium tumefaciens* (Chan et al 1993, Hiei et al 1994). We will present here our experience in using the two former techniques on temperate japonica rice varieties.

PEG-mediated direct gene transfer to protoplasts

Microspore callus- and embryo callus-derived cell suspension protoplasts of three rice varieties have been transformed using the PEG treatment originally reported by Krens and coworkers (1982) and later applied to indica rice protoplasts (Peng et al 1992). Comparison of efficiency of selection based on resistance to hygromycin, kanamycin and ammonium glufosinate mediated by the *hptIII*, *nptIII* and *bar* genes respectively has demonstrated the superiority of the latter for production of resistant calluses (Chair et al 1995). Cotransformation of protoplasts with two separate plasmids bearing the *gus* (pUGCI) and the *bar* genes (p35SAC), supplied in a concentration ratio of 2:1 and 1:1 respectively, led to resistant callus frequency of $0.8 \cdot 10^{-5}$ and $1.6 \cdot 10^{-5}$. Efficiencies of cotransformation based on dot blot analyses for integration of the *bar* gene and on histochemical assays for *gus* gene expression were 59.7% (2:1 ratio in favor of the nonselectable gene) and 37.9% (ratio 1:1).

Protoplasts of varieties Miara, Ariete and Lido have been further involved in cotransformation experiments including the p35SAC plasmid and several constructs consisting of the *gus* gene driven by various promoters and their deletions series. Absolute transformation efficiencies (number of resistant calluses per treated and plated protoplast) ranged from 1.1 to $14.9 \cdot 10^{-5}$ according to the genotype and between 34 and 73% of the ammonium glufosinate resistant calluses regenerated plants (Table 1). Thirty four to ninety per cent of the plants were albina, that frequency being higher among plants derived from protoplasts of germinal origin. Populations of transgenic plants derived from transformed haploid and diploid protoplasts exhibited ploidy levels ranging from n to $6n$ and from $2n$ to $8n$ including 40% and 20% diploid plants respectively (Table 2). Such high frequency polyploid plants is likely responsible for the frequent sterility or low fertility of transgenic plants regenerated from PEG treated protoplasts reported in the rice literature. Cotransformation frequency, estimated after test for ammonium glufosinate resistance and positive GUS histochemical assays of leaves of putative transgenic regenerated plants, averaged 50% in our conditions.

Microprojectile bombardment on immature zygotic embryos

Study of distribution of number of transient expression units of the *gus* gene driven by the maize ubiquitin promoter introduced through microprojectile bombardment (Particle inflow gun-type (Finer et al 1993) or BioRad PDS1000/He (Kikkert 1993) devices) on the scutellar cells of immature embryos of a range of varieties, permitted to clearly discriminate tropical and temperate japonica rice varieties. Tropical upland varieties proved less amenable to transient transformation than temperate japonicas, paralleling their lower ability for embryogenic callus induction from zygotic embryos. Recent results regarding optimization of both physical and physiological parameters of bombardment and culture and selection of the transformed tissues will be presented.

Promoter studies

Comparison of transient expression of the *gus* gene controlled by various constitutive promoters (CaMV35S,

eCaMV35S, CaMV35S-intAdh-1, pEmu, rice Act1, maize Ubi1) in constructs introduced both by PEG mediated transformation of protoplasts and particle bombardment on cell suspension platings permitted to identify pEmu (Last et al 1991) and Ubi1 (Christensen et al 1992) as the most active in rice cells. Tissue specific, developmentally regulated or wound inducible activity of various promoters has been studied by transferring translational fusion of these promoters and the *gus* gene to transgenic rice. Studied were a rice transfer lipid protein gene (*Ltp*)(Vignols et al 1993) promoter which is young leaf and epidermal cell layer specific, a maize protease inhibitor gene (Cordero et al 1994) which is wound inducible with systemic diffusion, and the Maize Streak Virus bidirectional promoter which is vascular tissue specific. Results of these studies will be presented.

Références:

- Cao J, Duan X, Mc Elroy D, Wu R (1992) *Plant Cell Rep*, 11:586-591
 Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM (1993) *Plant Mol Biol*, 22:491-506
 Chair H, Legavre T, Guiderdoni E (1995) *Plant Cell Rep*, in press
 Christou P, Ford T, Kofron M (1991) *Bio/Technology* 9:957-962
 Cordero MJ, Reventos D, San Segundo B (1994) *Plant J*, 6:141-150
 Finer JJ, Vain P, Jones MW, Mc Mullen MD (1992) *Plant Cell Rep*, 11:323-328
 Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) *Plant J*, 6:271-282
 Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) *Nature*, 296: 72-74
 Kikkert JR (1993) *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 33:221-226
 Last DI, Brettell RIS, Chamberlain DA, Chaudhury AM, Larkin PJ, Marsh EL, Peacock WJ, Dennis ES (1991) *Theor Appl Genet*, 81:581-588
 Li L, Qu R, De Kochko A, Fauquet C, Beachy RN (1993) *Plant Cell Rep* 12:250-255
 Peng J, Kononowicz H, Hodges T (1992) *Theor Appl Genet*, 83:855-863
 Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H (1989) *Nature* 337:274-276
 Vignols F, Lund G, Pammi D, Tremoussaygue D, Grellet F, Kader JC, Puigdomenech P, Delseny M (1994) *Gene* 142: 265-270
 Zhang W, Wu R (1988) *Theor Appl Genet*, 76:835-840

| Genotype | Ploidy of protoplasts ^a | Nb of experiments ^b | Nb of resistant calluses for 10 ⁵ treated protoplasts | | Nb resistant calluses tested for regeneration | Regeneration frequency | |
|----------|------------------------------------|--------------------------------|--|------|---|------------------------|------|
| | | | mean | SD | | mean | SD |
| Miara | n | 4 | 1.3 | 0.65 | 318 | 40.3 | 19.8 |
| Ariete | n | 1 | 1.1 | - | 48 | 72.5 | - |
| Ariete | 2n | 2 | 5.6 | 0.56 | 541 | 73.0 | 6.2 |
| Lido | 2n | 4 | 14.9 | 7.6 | 3646 | 33.8 | 8.1 |

^a: controlled by flow cytometry ^b:0.5-1 x 10⁷ protoplasts treated and plated in each experiment

Table 1: Results of PEG-mediated transformation of protoplasts of three japonica rice varieties

| Genotype | Ploidy of protoplasts | Nb of transgenic plants analyzed | Frequency of plants exhibiting a ploidy level of | | | | | |
|----------|-----------------------|----------------------------------|--|------|------|------|-----|------|
| | | | n | 2n | 3n | 4n | 5n | ≥6n |
| Miara | n | 111 | 0 | 40.5 | 21.6 | 35.1 | 2.8 | 0 |
| Ariete | 2n | 85 | 0 | 16.5 | 0 | 71.8 | 0 | 11.7 |
| Lido | 2n | 131 | 0 | 22.9 | 0 | 61.1 | 0 | 16.0 |

Table 2: Ploidy of plants regenerated from resistant calluses derived from PEG treated protoplasts isolated from 6-month old haploid or diploid cell suspensions.

Transformation génétique du riz par traitement de protoplastes au polyéthylène glycol et accélération de particules dans le scutellum d'embryons immatures

H. Chaïr, F. Georget, V. Cancade, T. Legavre, N. Michaux Ferrière et E. Guiderdoni
CIRAD-CA, projet Biotechnologies du Riz, BP5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

Le riz est la seule céréale chez laquelle des plantes transgéniques aient été obtenues de façon répétée suivant trois principales méthodes: transfert direct de gènes par traitement physique (electroporation)(Shimamoto et al 1989) ou chimique (Polyéthylène glycol)(Zhang et Wu 1988) de protoplastes, accélération de particules dans des suspensions cellulaires (Cao et al 1992), des scutellum (Christou et al 1991) ou des cals de scutellum (Li et al 1993) d'embryons et enfin récemment, infection de jeunes cals de scutellum par *Agrobacterium tumefaciens* (Chan et al 1993, Hiei et al 1994). Nous présenterons ici notre expérience de l'utilisation des deux premières techniques sur des variétés japonica tempérées de riz.

Transformation de protoplastes par le polyéthylène glycol

Des protoplastes isolés de suspensions cellulaires obtenues à partir de cals d'embryons immatures ou de cals de microspores de trois variétés de riz ont été transformés utilisant le traitement au polyéthylène glycol originellement mis au point par Krens et collaborateurs (1982) et ensuite appliqué au riz de type indica (Peng et al 1992). La comparaison de l'efficacité des sélections basées sur une résistance à l'hygromycine, à la kanamycine et au glufosinate d'ammonium conférées respectivement par les gènes *hptII*, *nptII* et *bar* a montré la supériorité de cette dernière quant à la production de cals résistants (Chaïr et al 1995). La cotransformation de protoplastes avec deux plasmides portant séparément le gène *gus* (pUGCI) et le gène *bar* (p35SAC), fournis respectivement avec des rapports de concentrations de 2:1 et de 1:1, a conduit à des fréquences d'obtention de cals résistants de $0,8 \cdot 10^{-5}$ et de $1,6 \cdot 10^{-5}$. L'efficacité de cotransformation basée sur la vérification de l'intégration du gène *bar* et l'expression du gène *gus* était respectivement de 59,7% (rapport 2:1 en faveur du gène non sélectionnable) et de 37,9% (rapport 1:1).

Les protoplastes des variétés Miara, Ariete et Lido ont ensuite été utilisés dans des expériences de cotransformation utilisant le plasmide p35SAC et une construction comprenant le gène *gus* contrôlé par divers promoteurs ou leurs délétions. Les efficacités de transformation absolues (nombre de cals résistants par rapport au nombre de protoplastes traités et mis en culture) variaient de $1,1$ à $14,9 \cdot 10^{-5}$ suivant le génotype et 34 à 73% des cals résistants au glufosinate d'ammonium ont régénéré des plantes (Tableau 1). 34 à 90% des plantes régénérées étaient albina, cette fréquence étant plus élevée parmi les plantes issues de protoplastes d'origine germinale. Les populations de plantes transgéniques issues de protoplastes haploïdes et diploïdes transformés présentaient une gamme de niveaux de ploïdie de n à $6n$ et de $2n$ à $8n$ respectivement dont 40% et 20% de plantes diploïdes (Tableau 2). Ce pourcentage élevé de plantes présentant un niveau de ploïdie anormal est sans doute responsable des fréquences élevées de plantes infertiles ou faiblement fertiles signalées en transformation de protoplastes de riz par le PEG. La fréquence de cotransformation estimée d'après la résistance au glufosinate d'ammonium et une réaction positive au test histochimique GUS des feuilles des plantes transgéniques régénérées est en moyenne de 50% dans nos conditions.

Transformation d'embryons immatures par le canon à particules

L'étude la répartition des unités d'expression transitoire du gène *gus* contrôlé par le promoteur de l'ubiquitine du maïs introduit par accélération de particules (Systèmes de type à flux d'hélium (Finer et al 1993) ou BioRad PDS1000/He (Kikkert 1993)) dans le scutellum d'embryons d'un échantillon de variétés, permet de séparer les génotypes japonica tropicaux des japonica tempérés. Les variétés pluviales tropicales présentent en général une réponse inférieure à la transformation transitoire. Ceci est à mettre en parallèle avec leur plus faible aptitude à l'induction de cultures embryogènes à partir d'embryons zygotiques. Des résultats récents portant sur l'optimisation des paramètres physiques et physiologiques du bombardement et

des conditions de culture et de sélection des tissus transformés seront présentés.

Etude de promoteurs

La comparaison de l'expression transitoire du gène *gus* contrôlé par plusieurs promoteurs constitutifs (CaMV35S, eCaMV35S, CaMV35S-intAdh-1, pEmu, Act1 du riz, Ubi1 du maïs) dans diverses constructions introduites à la fois par traitement au PEG de protoplastes et bombardement de particules sur des étalements de suspensions cellulaires a permis d'identifier les promoteurs pEmu (Last et al 1991) et Ubi1 (Christensen et al 1992) comme les plus actifs dans les cellules de riz.

L'activité tissu spécifique, régulée dans le développement ou inductible de différents promoteurs a été étudiée en transférant dans des riz transgéniques des fusions traductionnelles de ces promoteurs avec le gène *gus*. Les promoteurs étudiés sont le promoteur d'un gène de transfert des lipides (*Ltp*) du riz (Vignols et al 1993), spécifique des jeunes feuilles puis des épidermes, le promoteur d'un gène d'inhibiteur de protéase du maïs (Cordero et al 1994) inductible et à diffusion systémique, et le promoteur bidirectionnel d'un gène du virus du streak du maïs, spécifique des tissus vasculaires. Les résultats de ces études seront présentés.

Références:

- Cao J, Duan X, Mc Elroy D, Wu R (1992) *Plant Cell Rep*, 11:586-591
 Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM (1993) *Plant Mol Biol*, 22:491-506
 Chair H, Legavre T, Guiderdoni E (1995) *Plant Cell Rep*, sous presse
 Christou P, Ford T, Kofron M (1991) *Bio/Technology* 9:957-962
 Cordero MJ, Reventos D, San Segundo B (1994) *Plant J*, 6:141-150
 Finer JJ, Vain P, Jones MW, Mc Mullen MD (1992) *Plant Cell Rep*, 11:323-328
 Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) *Plant J*, 6:271-282
 Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) *Nature*, 296: 72-74
 Kikkert JR (1993) *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 33:221-226
 Last DI, Brettell RIS, Chamberlain DA, Chaudhury AM, Larkin PJ, Marsh EL, Peacock WJ, Dennis ES (1991) *Theor Appl Genet*, 81:581-588
 Li L, Qu R, De Kochko A, Fauquet C, Beachy RN (1993) *Plant Cell Rep* 12:250-255
 Peng J, Kononowicz H, Hodges T (1992) *Theor Appl Genet*, 83:855-863
 Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H (1989) *Nature* 337:274-276
 Vignols F, Lund G, Pammi D, Tremoussaygue D, Grellet F, Kader JC, Puigdomenech P, Delseny M (1994) *Gene* 142: 265-270
 Zhang W, Wu R (1988) *Theor Appl Genet*, 76:835-840

| Génotype | Ploidie des protoplastes à l'isolement ^a | Nb d'expérience s ^b | Nb cals résistants pour 10 ⁵ protoplastes traités | | Nb de cals résistants testés pour la régénération | Fréquence de régénération | |
|----------|---|--------------------------------|--|------------|---|---------------------------|------------|
| | | | moyenn e | écart type | | moyenn e | écart type |
| Miara | n | 4 | 1,3 | 0,65 | 318 | 40,3 | 19,8 |
| Ariete | n | 1 | 1,1 | - | 48 | 72,5 | - |
| Ariete | 2n | 2 | 5,6 | 0,56 | 541 | 73,0 | 6,2 |
| Lido | 2n | 4 | 14,9 | 7,6 | 3646 | 33,8 | 8,1 |

^a: contrôlé par cytométrie en flux ^b: 0,5-1 x 10⁷ protoplastes traités et mis en culture dans chaque expérience
 Tableau 1: Résultats des expériences de transfert direct de gènes dans les protoplastes de 3 variétés japonicade riz

| Génotype | Ploidie des protoplastes | Nb de plantes transgeniques analysées | Fréquence de plantes présentant un niveau de ploidie de | | | | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------------|---|------|------|------|-----|------|
| | | | n | 2n | 3n | 4n | 5n | ≥6n |
| Miara | n | 111 | 0 | 40,5 | 21,6 | 35,1 | 2,8 | 0 |
| Ariete | 2n | 85 | 0 | 16,5 | 0 | 71,8 | 0 | 11,7 |
| Lido | 2n | 131 | 0 | 22,9 | 0 | 61,1 | 0 | 16,0 |

Tableau 2: Ploidie des plantes régénérées de cals résistants issus de protoplastes traités au PEG et isolés de suspensions cellulaires haploïdes ou diploïdes âgées de 6 mois.

Transformación de variedades de arroz *indica* en Costa Rica

Marta VALDEZ¹, Marco PAEZ, Miguel MUÑOZ², Rafael VEGA¹, Griselda ARRIETA, Tania QUESADA, Reinhard ACUÑA¹, Joachim de MIRANDA y Ana ESPINOZA.

CIBCM, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

¹ Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

² Department of Biochemistry, Cornell University, U.S.A.

La producción de arroz, cereal número uno en la dieta de los costarricenses, se ve actualmente afectada por varios factores que van desde la disponibilidad de pocas variedades en el mercado semillero del país, hasta una serie de problemas fitosanitarios ocasionados por plagas, enfermedades y malezas de difícil combate.

Un estudio sobre variabilidad genética demostró que las variedades comerciales costarricenses exhiben un alto grado de parentesco. Esto representa un riesgo, en vista de que la homogeneidad genética favorece el desarrollo de epifitias, situación a la que se enfrentan hoy los agricultores costarricenses con la incidencia generalizada de una enfermedad causada por el virus de la hoja blanca del arroz (RHBV). Esa enfermedad es particularmente grave en el país ya que ninguna de las variedades comerciales es resistente al virus ni al insecto.

Además de la virosis antes mencionada se presentan varias plagas de insectos, la más importante de las cuales es el delfácido *Tagosodes orizicolus*. Este insecto no solo es el vector del RHBV sino que ocasiona graves daños en la planta al alimentarse y ovipositar. Dada su ineffectividad en el control de *T. orizicolus*, la aplicación cada vez más intensiva de insecticidas para reducir las poblaciones del insecto, tiene graves repercusiones en el ambiente.

Aparte de los factores citados, hay dos malezas importantes en el arrozal: *Echinochloa colona* y el arroz rojo (*Oryza sativa*), este último de particular importancia ya que es un contaminante indeseable del arroz comercial, incompatible químicamente en posemergencia. Cabe mencionar que varias malezas asociadas al arroz son hospederas alternas de delfácidos y de otras especies de tenuivirus relacionados con el RHBV. Esto representa un riesgo de recombinación entre tenuivirus, con el potencial surgimiento de nuevas variantes del RHBV.

El propósito de nuestra investigación es introducir, mediante ingeniería genética, en variedades comerciales de arroz tres tipos de resistencia: al RHBV, al insecto *T. orizicolus* y al herbicida fosfinothricin (PPT), conocido comercialmente como Basta. La introducción de dichos genes a variedades ya aceptadas por el público pretende combatir el RHBV, el daño mecánico ocasionado por *T. orizicolus* al alimentarse y transmitir el RHBV y el arroz rojo, que sería susceptible al Basta mientras que el arroz transgénico no lo es.

Fuentes de resistencia

Los genes más efectivos en el control de enfermedades virales se derivan del mismo virus, principalmente los de la proteína de cubierta y la polimerasa. La expresión transgénica de dichos genes, introducidos en el sentido viral u opuesto, altera las estrategias normales de expresión inhibiendo o retardando la infección del virus. Para este efecto nuestro grupo en el CIBCM clonó y secuenció cuatro de los cinco ARNs que constituyen el genoma del RHBV y del EHBV, tenuivirus muy relacionado al RHBV, cuyo hospedero principal es la maleza *E. colona*.

La resistencia transgénica más versátil y exitosa contra insectos se ha logrado mediante la incorporación de las proteínas *Bt* de *Bacillus thuringiensis*, inhibidores de tripsina o lectinas. Cada una de estas proteínas es específica para un grupo determinado de insectos masticadores. Sin embargo, los delfácidos, chupadores que se alimentan directamente del floema, tienen una fisiología diferente a la de los masticadores. Se intentará transformar con una lectina no tóxica a mamíferos que han mostrado tener acción insecticida específica contra este grupo de insectos.

También se intenta conferir resistencia al herbicida PPT, mediante la introducción del gen Bar. La expresión de la enzima PPT-acetiltransferasa permite detoxificar dicho herbicida en el tejido transgénico. Para efectos de resumen, se enfocan a continuación tres áreas claves en las cuales trabaja el grupo, para lograr la transformación en arroz.

Cultivo de tejidos

En el país se siembran seis variedades comerciales de arroz. De ellas, la variedad CR-5272 responde bien al cultivo *in vitro*, y con la cual se trabaja para efectos de optimización del sistema y su uso posterior para la transformación genética del tejido. Se obtuvo un 99% de calogénesis a partir de embriones maduros, y se establecieron suspensiones celulares embriogénicas, con altas tasas de multiplicación.

Paralelamente se realizó un estudio histológico de los tejidos, con el fin de mejorar el proceso de embriogénesis somática y la selección del tejido más apropiado para la transformación. También se optimizaron las condiciones de regeneración, tanto de callos como de suspensiones celulares, con resultados prometedores.

Además se logró producir protoplastos, a partir de las suspensiones celulares, y actualmente se evalúa la viabilidad y capacidad de regeneración.

Transformación

Con el fin de optimizar el sistema de introducción de genes foráneos al tejido de arroz, se utilizó un plásmido que contiene el gen reportero GUS, unido al promotor del gen de la actina del arroz y la secuencia de terminación NOS. Con esta construcción se obtuvo expresión de la enzima glucuronidasa en callos, obtenidos a partir de embriones maduros de 10, 15 y 20 días, así como en microcallos de suspensiones celulares.

La introducción de los genes foráneos se realizó mediante la precipitación del ADN de interés sobre partículas de tungsteno y su posterior propulsión con helio en expansión en un aparato casero, construido de acuerdo con el esquema de Finer.

Actualmente se optimizan las condiciones de electroporación de protoplastos (en un Electroporador Bio-Rad), con el fin de probar otro método alternativo de transformación.

A su vez se realizaron pruebas de toxicidad al herbicida Basta, tanto en callos como en suspensiones celulares, con el fin de determinar la dosis letal para los futuros experimentos de selección de los tejidos transformados.

Transformation of *indica* Rice Varieties in Costa Rica

Marta VALDEZ¹, Marco PAEZ, Miguel MUÑOZ², Rafael VEGA¹, Griselda ARRIETA, Tania QUESADA, Reinhard ACUÑA, Joachim de MIRANDA and Ana ESPINOZA

CIBCM, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

1 Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

2 Department of Biochemistry, Cornell University, U.S.A.

The production of rice, the primary cereal of the Costa Rican diet, is threatened by phytosanitary problems such as viral and fungal diseases, insect plagues and weeds.

A study of genetic variability in the rice crop has demonstrated that the commercial strains display a high degree of relatedness, or parentage. This genetic homogeneity increases the risk of disease epidemics, since all varieties have similar levels of vulnerability. The danger is exemplified by the spread of the disease caused by the rice hoja blanca virus (RHBV), which has become a serious problem in Costa Rica because none of the commercially-grown rice varieties are resistant to either the virus or the insect vector.

There are also insect pests which attack the rice crop, the most important being the delphacid *Tagosodes orizicolus*. This insect is not only the vector of RHBV, but is a major pest in its own right, causing severe damage to rice plants through feeding and oviposition. The application of increasingly high doses of chemical insecticides only partially controls the insect population and has serious environmental consequences.

Aside from the hoja blanca virus and the delphacid insect pest, the weeds *Echinochloa colona* and red rice (*Oryza sativa*) cause severe quantitative and qualitative losses to the Costa Rican rice crop. Control of red rice is particularly urgent because it is already an undesired contaminant of the commercial rice harvest; since it is of the same genetic family as the commercial rice, no herbicide currently exist which can differentiate between the two. As a potential alternative host for *Tagosodes orizicolus* and the common host for other delphacids carrying different tenuiviruses, the weed *Echinochloa* represents a potential site for recombination between those viruses, which may produce new strains of the RHBV virus that can defeat specific control strategies.

Because of the dearth of natural sources of resistance, traditional breeding strategies cannot alleviate the phytosanitary risks. The goal of the research in the RHBV group of the Cellular and Molecular Research Center (CIBCM) is to use genetic engineering to introduce foreign genes conveying three different types of resistance to commercial rice varieties: resistance to the virus RHBV, to the delphacid insect *T. orizicolus*, and to the herbicide phosphinothricin (PPT; commercially known as Basta). The introduction of the first two types of genes can generate *indica* rice varieties resistant to the virus and insect plagues. The PPT resistance genes can protect the commercial crop from the herbicide, while red rice remains susceptible to the same herbicide.

Sources of Resistance

Since little resistance to the virus and insect pests, or to the common herbicides, exists in the gene pool of commercially-grown *indica* rice, other sources of resistance genes are being sought. The genes most effective in controlling viral diseases have come from the viruses themselves, principally the genes encoding the coat protein and the polymerase. The transgenic expression of these genes in rice, either in sense or anti-sense orientation, slows or inhibits the normal replication strategies of the virus during infection. To use this effect, the RHBV group has cloned and sequenced three of the five RNAs that constitute the genome of RHBV and of *Echinochloa* hoja blanca virus (EHBV), a tenuivirus very similar to RHBV whose principle host is the weed *Echinochloa colona*. Experiments are now underway to clone the remaining RNAs.

The most versatile and successful transgenic resistance to insects has been achieved with the incorporation of genes encoding the endotoxic proteins of the bacteria *Bacillus thuringiensis*, as well as lectins and trypsin inhibitors. Each of these proteins is effective against a particular type of chewing insect. Unfortunately, the *B. thuringiensis* proteins have not been successful against the delphacids which unlike the chewing insects feed directly from the phloem. The RHBV group plans to transform plants with the gene encoding a lectin from another source which has been shown to be harmless to mammals but damaging to some members of the delphacid family. Other lectins and proteinase inhibitors may be shown to be effective against the digestive metabolism of the delphacid *T. orizicolus* in planned artificial diet bioassays; the genes encoding these would become candidates for transformation as well.

Resistance to the herbicide PPT can be conferred by the introduction of the Bar gene, which encodes the enzyme PPT-acetyltransferase. This enzyme can detoxify the herbicidal chemical in the transgenic plant.

Tissue Culture

Six varieties of *indica* rice are commercially sown in Costa Rica. Of these, the variety known as CR-5272 responds best to *in vitro* cultivation, and has thus been used for optimization of transformation and regeneration techniques. We now obtain 99% callogenesis from mature embryos, and embryonic cell cultures with high levels of multiplication have also been established.

In parallel, we have conducted a histological study to determine the best process for somatic embryogenesis and the ideal tissue for transgenic transformation. The conditions for regeneration from calli and from cell suspensions have also been explored, with promising results.

We have also achieved the production of protoplasts from the cell culture suspensions and are now assessing their viability and capacity for regeneration.

Transformation

To optimize a system for the introduction of foreign genes into rice tissue, we are using a plasmid containing the GUS reporter gene fused to the rice Actin promoter and the NOS termination sequence. With this construct we have obtained the expression of the glucuronidase enzyme in calli derived from 10, 15, and 20 day-old embryos as well as in microcalli from cell culture suspensions.

The delivery of the foreign genes is accomplished by precipitating the desired DNA on tungsten particles, which are then propelled into mounted plant tissue by the expansion of helium in a particle gun apparatus constructed here according to the scheme described by Finer.

We are currently optimizing the conditions for transformation of protoplasts by electroporation (with a Bio-Rad Electroporator) to provide an alternative method of transformation.

Finally, we are also testing the toxicity of the PPT herbicide on calli and cell suspensions to determine lethal doses for the selection of transformed tissues in future experiments.

PROBLEMATICA REGIONAL - PROBLEMATIQUE REGIONALE

La problématique régionale de la culture des bananiers de consommation domestique

Thierry Lescot

CIRAD-FLHOR, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

La région Amérique latine - Caraïbes produit environ les 2/5 de la production mondiale de bananes, bananes plantain et autres bananes de consommation domestique avec un peu moins de 30 millions de tonnes. Cette région est aussi la première exportatrice, mais 67% de sa production est consommée localement et constitue l'une des principales bases de l'alimentation.

Les systèmes de production sont variés et parfois complexes, ils vont des productions de subsistance en culture associée aux cultures monospécifiques intensives de type banane d'exportation. Les actes techniques définissant les systèmes de culture sont moins variés, l'utilisation d'intrants est peu fréquente et souvent liée à une faible valorisation des productions. Les niveaux de durabilité sont fortement dépendants de la qualité des sols, cependant l'intensification de la culture crée souvent des déséquilibres nutritionnels et des activités biologiques qui limitent plus fortement cette durabilité. Les niveaux d'organisation de l'écoulement des productions marchandes sont faibles et liés à une dynamique de marché peu élaborée.

Mots Clés : Banane ; Banane plantain ; Culture ; Système de culture ; Système de production ; Production ; Durabilité ; Fertilité ; Amériques.

La problemática regional del cultivo del banano y plátano de consumo doméstico

Thierry Lescot

CIRAD-FLHOR, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

La región América latina - Caribe produce al rededor de los 2/5 de la producción mundial de banano, plátano y otros bananos de consumo local con casi 30 millones de toneladas. Esta región es también la primera exportadora, pero 67% de esta producción esta consumido localmente y constituye uno de los productos básicos de la alimentación.

Los sistemas de producción son variados y algunas veces complejos, van desde producciones de subsistencia en cultivos asociados hasta los cultivos monoespecificos intensivos de tipo banano de exportación. Los actos técnicos que caracterizan los sistemas de cultivo son menos variados, el uso de entrantes es poco frecuente y muchas veces ligado a una baja valorización de la producción. Los niveles de sostenibilidad son fuertemente dependientes de la calidad de los suelos, sin embargo, la intensificación del cultivo favorece muchas veces los desbalances nutricionales y las actividades biológicas quienes limitan fuertemente esta sostenibilidad.

Los niveles de organización para mercadear esas producciones son bajas y ligados a una dinámica de mercado poco elaborada.

Palabras llaves : Banano ; Plátano ; Cultivo ; Sistema de cultivo ; Sistema de producción ; Producción ; Sostenibilidad ; Fertilidad ; Américas ; Caribe.

FITOPROTECCION - PHYTOPROTECTION

LA SIGATOKA NEGRA / LA CERCOSPORIOSE NOIRE

Global population structure of the bananas Black Leaf Streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*

J. Carlier, X. Mourichon

CIRAD-FLHOR, UR.BCPR, Laboratoire de Pathologie Végétale, BP.5035, 34032 Montpellier Cedex, France.

The genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* population around the world was examined using DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Allele frequencies at 19 RFLP loci were estimated with a sample of 136 *M. fijiensis* isolates from five geographical populations representative of the banana producing areas (Southeast Asia including Philippines and Papua New Guinea, Africa, Latin America, and Pacific Islands). Within each populations gametic disequilibrium test between the 19 RFLP loci were mainly non significant ($P > 0.05$) indicating that random sexual reproduction occurred in these populations. All *M. fijiensis* populations had a high level of allelic diversity (gene diversity, $H: 0.251$ to 0.587). The highest levels of allelic diversity was found in the two Southeast Asian populations ($H: 0.587$ and 0.570). Most of alleles detected in recently introduced populations (Africa, Latin America, and Pacific Island) were also detected in Southeast Asia populations. Furthermore, we found a high and significant ($P < .005$) level of genetic differentiation among *M. fijiensis* geographic populations (F_{st} value of 0.32).

These results strongly supported that *M. fijiensis* originated from Southeast Asia and spread recently to other parts of the world. However, our data cannot attest if one of the two Southeast Asia regions studied (Philippines and PNG) is the center of origin of BLSD. The level of allelic diversity in *M. fijiensis* populations from other regions than Southeast Asia was drastically reduced indicating founder effects. These data also suggested rare events of *M. fijiensis* migration among continents. The relevance of this global population structure is discussed with a view to breed bananas resistant to *M. fijiensis*.

Carlier J., Mourichon X., Gonzales de Leon D., Zapater MF. and Lebrun MH., 1994 - DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot diseases. *Phytopathology*, 84:751-756

Carlier J., Lebrun M.H., Zapater M.F., Dubois C. et Mourichon X., 1995 - A world population genetic structure of the banana black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology*. (in preparation).

Evidence of a constitutive polyphenolic component in resistance (partial/horizontal resistance) of banana to *Mycosphaerella fijiensis*.

X. Mourichon, J. Carlier

CIRAD-FLHOR, UR.BCPR, Laboratoire de Pathologie Végétale, BP.5035, 34032 Montpellier Cedex, France.

Black Leaf Streak Disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*) is a serious threat to AAA bananas, AAB plantains, and other cooking bananas. Three kind of reactions - susceptibility, S, partial resistance, PR, high resistance, HR - characterise all wild and cultivated banana varieties (AA, AAA, AAB, ABB) (1). Host-parasite interaction studies were conducted under controlled conditions involving artificial inoculations of susceptible (Grande naine, AAA), partially (Pisang awak, ABB) and highly resistant host (Yangambi km5, AAA). Biochemical and cytological studies (photonic and electronic microscopy) display two distinct interactions (2). In the highly resistant host, a defense mechanism is displayed just after the stomatal penetration. The cultivars have similar leaf tissue structure. The partially resistant Fougamou, however, is distinguishable from other two hosts by the presence of numerous specialized polyphenol-storing cells in parenchyma. During the infection, the material is released into the intercellular spaces and present a high affinity for host cell and parasite walls. It is demonstrated that this polyphenolic material may not have a crucial role in the early infection stages but it has a definite effect once necrosis begins.

To determine the degree of involvement of this constitutive component in partial resistance, the leaf soluble phenolic content was studied for eleven banana varieties displaying different resistance levels to *M. fijiensis*. Phenolic compounds were separated by chromatography and analysed by HPLC, TLC and spectrophotometry. The soluble phenolic pool is represented in each banana variety by flavonol glycosides, hydroxycinnamic derivatives (HCDs) and polymeric flavan-3-ols (condensed tannins). No significant difference has been shown between sensitive and partially resistant varieties banana concerning flavonols. Depending on varieties, HCDs constitute only 5 to 10 % of total phenolics and some partially resistant varieties contain two to three-fold more HCDs than sensitive one's. Flavan-3-ols contents (mg eq.catechin/gMS) may be significantly strongly different among the partially resistant hosts and a clear relation has been established between these contents and the level of partial resistance (3).

(1) Fouré E., M.Pefoura et X.Mourichon, 1990 - Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* au cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génomiques. *Fruits*, 45, 329-338

(2) Beveraggi A., X.Mourichon et G.Sallé, 1995 - Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercopora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) responsable de la maladie des raies noires. *Can. J. Bot.* (accepted for publication).

(3) Mourichon X., Gire A., Macheix JJ., 1994 - Evidence of a constitutive polyphenolic component in resistance of banana to *Mycosphaerella fijiensis*. (en préparation).

Study of elicitors associated with resistance of banana cultivar Yangambi Km 5 to *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Riveros Angarita A. S. and P. Lepoivre** [1995].

* Faculté des Sciences Agronomiques, UER de Phytopathologie, Gembloux, Belgique

** Universidad del Tolima, Ibagué (Tolima) Colombie

Mycosphaerella fijiensis Morelet, the banana Black Leaf Streak agent, causes one of the most devastating and worldwide diseases of banana and plantains.

Necrosis of the stomatal cell guards and fluorescent appositions around the penetration sites of *M. fijiensis* are associated to the early blockage of leaf infections in the highly resistant cultivar Yangambi Km 5.

Intercellular washing fluids prepared from leaves either of the susceptible cultivar Grande Naine or the resistant cultivar Yangambi Km 5, inoculated for 7 days with *M. fijiensis*, have been injected into uninoculated leaves of both cultivars.

After 48 hours, a significant enhancement of glucanase activity in leaf extracts of both cultivars was observed thus suggesting that of eliciting activity uninoculated leaves and the elicitation they cause in healthy leaves were cultivar non-specific.

At 6-8 days after injection, however, necrosis and fluorescent appositions were induced more intensively and more rapidly in the highly resistant cv. Yangambi Km 5 than in the susceptible Grande Naine. Induction of necrosis and fluorescent appositions was also observed in banana leaves injected with the spore germination fluid of *M. fijiensis*.

Elicitation of necrosis and fluorescent apposition was associated to high molecular weight compound(s), which appeared stable after treatment at high temperature and extreme pH, were unaffected by protease treatments, but lost their effect after periodate oxidization, thus suggesting that polysaccharide compounds are involved in the elicitation.

The precipitate formed after treatment of the spore germination fluid, concentrated the eliciting activity; a separer HPLC analysis, of the preparation showed one single homogeneous pick.

Laminarin, a commercial glukan, also showed a necrosis and fluorescent apposition eliciting activity.

Etude d'éliciteurs associés à la résistance du cultivar de bananier Yangambi Km 5 à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Riveros Angarita A. S. and P. Lepoivre** [1995].

Faculté des Sciences Agronomiques, UER de Phytopathologie, Gembloux, Belgique

** Universidad del Tolima, Ibagué (Tolima) Colombie

Mycosphaerella fijiensis Morelet, l'agent des raies noires du bananier, est responsable d'une des maladies les plus dommageables chez les bananiers et les plantains.

Des nécroses des cellules de garde et d'appositions fluorescentes autour des sites de pénétration de *M. fijiensis*, sont associées à l'arrêt de l'infection chez les cultivars très résistantes comme Yangambi Km 5. Des extraits intercellulaires des feuilles des cultivars sensibles (Grande Naine) et résistant (Yangambi Km 5) préparés 7 jours après leur inoculation avec *M. fijiensis*, ont été injectés dans les feuilles non inocuées des mêmes cultivars.

48 heures après leur injection, ces extraits intercellulaires induisent une augmentation significative de l'activité glucanase des extraits foliaires des 2 cultivars suggérant que ni la présence de cette activité élicitrice ni l'induction de l'activité glucanase n'est spécifique du cultivar.

6-8 jours après l'injection des mêmes extraits intercellulaires, des nécrose et d'appositions fluorescentes ont été induites plus intensément et plus rapidement dans les feuilles du cultivar résistant Yangambi Km 5 que chez le cultivar sensible Grande Naine.

Une induction similaire des nécroses et d'appositions fluorescentes est observée dans les feuilles de bananier traitées par injection des surnageants de spores de *M. fijiensis* en germination.

L'activité élicitrice des nécroses et d'appositions fluorescentes était associées à de(s) compose(s) de haut poids moléculaire, apparaissait stable après un traitement à des températures élevées ou à des pH extrêmes, n'était pas affectée par un traitement aux protéases mais a disparu avec l'oxydation par le periodate de sodium; suggérant que de(s) compose(s) polysaccharidiques pourrai(en)t être impliqué(s) dans l'élicitation. Le précipité à l'éthanol des surnageants de spores en germination présentait cette activité élicitrice et son analyse par HPLC a révélé un seul pic homogène.

La laminarine, un glucane commercialement disponible présentait la même activité élicitrice des nécroses et d'appositions fluorescentes.

Varietal Susceptibility and genetic determinism of resistances to banana Black Leaf Streak.

E. Foure and K. Tomekpe

Centre Regional de Recherches sur Bananiers et Plantains; Cameroun.

Research led for many years at the Centre Regional de Recherches sur Bananiers et Plantains (CRBP), on the black leaf streak has shown three main host reactions: highly resistant phenotype (HR), partially resistant phenotype (PR) and susceptible phenotype (S). Different levels of reactions observed between partial resistance and susceptibility seem to have a quantitative basis. Preliminary results from the study of structural and biochemical mechanisms determining plays a role in the expression of partial resistance. Different levels of high resistance have also been observed.

Comparative studies on the different levels of partial resistance and susceptibility are being made. A study on the macroscopic evolution of necrosis within the high resistance phenotype is to be initiated as well as a study of the early stages of infection, based on a photon microscopy, 50 accessions from different genomic groups are already being screened for resistance.

Genetic basis of resistances to black leaf streak are being studied through screening of hybrid populations issued from wild diploid bananas showing different levels of resistance and susceptibility. These are *M. a. burmanicoïdes*, type Calcutta 4 (HR), *M. a. zebrina*, type Zebrina (PR), *M. a. banksii*, type Banksii (PR), *M. a. banksii*, type Madang (S) and *M. a. microcarpa*, type Truncata (HR). Screening of 37 hybrids from Calcutta 4 x Madang (CAM) and of 24 hybrids from Truncata x Madang (TRUMA) shows that phenotype HR is highly inherited. Crossings HR x S, HR x PR and PR x S are being realized in order to screen 200 to 250 PR hybrids. Later on, 200 to 250 F₂ hybrids issued from a sole F₁ selfing will also be screened. The analysis of resistance and susceptibility ratios of these selfed and out crossed populations should allow significant progress in the understanding of genetic control and of inheritance of resistances.

In the meantime, a population of 967 individuals issued from selfing of synthetic hybrid M53 (phenotype PR) is being screened. Preliminary results seem to corroborate ratios recorded in a previous population of 250 individuals also issued from M53 selfing (60% of HR and 40% of PR), the absence of susceptible phenotype and the presence of pronounced HR phenotype. These results reveal the complexity of the resistances to black leaf streak genetic determinism and phenotype interactions.

Sensibilité variétale et déterminisme génétique des résistances à la Cercosporiose noire des bananiers

E. Foure et K. Tomekpe

Centre Régional de Recherches sur Bananiers et Plantains Cameroun

Les recherches réalisées depuis plusieurs années sur la sensibilité à la cercosporiose noire ont permis de caractériser trois principaux types de comportement variétal vis à vis de cette maladie: les phénotypes TR (bananiers très résistants), RP (bananiers partiellement résistants) et S (bananiers sensibles). La distinction entre les phénotypes RP et S apparaît de nature puriment quantitative. Les résultats préliminaires des études menées sur les mécanismes biochimiques et structuraux de ces phénotypes semblent montrer le rôle de la composante polyphénolique constitutive des feuilles du bananier. Un gradient semble exister d'autre part à l'intérieur du phénotype TR.

L'étude comparative des différents niveaux de sensibilité et de résistance partielle est actuellement en cours. Les différents phénotypes TR doivent faire l'objet d'une étude de l'évolution macroscopique de la necrose. Une étude en microscopie photonique des premières étapes de l'infection paratatare va également être engagée. Cinquante accessions appartenant à divers groupes génomiques sont par ailleurs criblées au champ vis à vis de la cercosporiose noire.

Le déterminisme génétique des résistances est étudié grâce à des populations hybrides issues de parents de niveaux de sensibilité différents: *M. a. burmanicoïdes* type Calcutta 4 (TR), *M. a. zebrina* type Zebrina (RI), *M. a. banksii* type Banksii, *M. a. banksii* type Madang (S) et *M. a. microcarpa* type Truncata (TR). L'évaluation de 37 hybrides CAM (Calcutta 4 x Madang) et 24 hybrides TRUMA (Truncata x Madang) montre que la résistance TR est fortement héritable. De nouveaux croisements TR x S, TR x RP et RP x S sont en cours de réalisation afin d'évaluer l'autofécondation d'un individu F1 seront évalués analyse des ségrégations de ces diverses populations devrait permettre une avancée significative dans la compréhension du déterminisme génétique des résistances.

D'autre part, une population de 967 individus issue de l'autofécondation de l'hybride synthétique M53 (phénotype RP) est en cours d'évaluation; les premiers résultats semblent confirmer les proportions enregistrées dans une première population de 250 individus également issue d'une autofécondation de M53 (60% de TR, 40% de RP), l'absence de phénotypes sensibles et la présence de phénotypes TR très marqués. Ces résultats montrent la complexité du déterminisme génétique des résistances et des interactions entre les différents phénotypes.

Estudio de la asociación de *Mycosphaerella musicola* y *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa* sp.

Ana Cecilia Tapia¹, Jean Vincent Escalant¹, L. Felipe Arauz², Rolando Mata³.

(1) CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

(2) UCR, San Jose, Costa Rica.

(3) UCR, Turrialba, Costa Rica.

El banano y el plátano son dos musáceas muy importantes en América Central, en algunas regiones del Caribe y América del Sur, por ser una fuente de alimento y entrada de divisas a los países de dichas regiones.

La productividad de dichas musáceas se ve afectada por un complejo de enfermedades denominado Sigatoka que incluye dos especies del género *Mycosphaerella* : *Mycosphaerella musicola* y *Mycosphaerella fijiensis*.

Estas enfermedades representan en los países donde se encuentran en primer problema fitosanitario de estos cultivos.

Se ha generalizado que cuando hace ingreso la sigatoka negra a una región desplaza a la sigatoka amarilla, progresivamente hasta que desaparece de dicha región . Sin embargo se ha observado en zonas de altura (1200 y 1350 msnm) la presencia de las dos enfermedades afectando severamente a los hospederos donde se establecen.

En Costa Rica es común encontrar en zonas cafetaleras de altura el uso de algunas musáceas como sombra de este cultivo, lo cual les permite obtener otras ganancias adicionales a las que les provee el cultivo principal.

En sentido el proyecto CIRAD/CATIE, se avocó a estudiar en condiciones de Costa Rica estas dos enfermedades. Una investigación inicial tuvo el objetivo de estudiar la distribución altitudinal de las dos enfermedades en una región determinada, y posteriormente a nivel de laboratorio e invernadero, las relaciones y factores que afectan el comportamiento de ambos patógenos en el filoplano de algunas musáceas.

La primera investigación se realizó en cinco localidades ubicadas entre el Cantón de Turrialba y Jiménez, las cuales se seleccionaron con base en la altura sobre el nivel del mar: 1350, 1200, 1000, 900, y 600 msnm. En dichas localidades se escogieron al azar plantas de banano 'Gros Michel en las cuales se extraían mensualmente muestras foliares con síntomas de las dos enfermedades para evaluar la presencia y la ausencia de una o la otra enfermedad.

En las muestras provenientes de la alturas superiores, se observaron en mayor proporción las estructuras típicas de *Cercospora musae* denominadas esporodoquios con abundantes conidios, así como se pudo identificar las estructuras asexuales de *Paracercospora fijiensis* en lesiones separadas o en asocio con *C. musae*. También se identificaron estructuras intermedias entre ambas especies.

Los resultados de esta investigación reflejan que la presencia y ausencia de una u otra especie está relacionada con la altura sobre el nivel del mar y con las condiciones climáticas que imperen en la zona.

En la segunda etapa de la investigación se realizaron pruebas de laboratorio para evaluar el efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios de ambas especies. Las temperaturas seleccionadas fueron: 15, 17, 23, 27 y 30 C y se evaluó la germinación a intervalos de : 2, 4, 8, 16, y 24 horas. Además se realizó un ensayo en invernadero con el objetivo de observar si variando las proporciones de inóculo de las dos especies el desarrollo de los síntomas difería.

Los resultados sobre la germinación de conidios de las dos especies evidencian que a la temperatura de 15 °C, la germinación de los conidios de *M. musicola* (70%) es mayor que la de conidios de *M. fijiensis* (25%). A 17°C, la germinación es similar para ambas especies. A temperaturas superiores (23, 27, y 30 °C) los porcentajes de germinación son mayores para *M. fijiensis*.

Las inoculaciones con mezcla de ambas especies, los resultados obtenidos tienen un comportamiento similar con respecto a la temperatura que cuando se realizó separadamente. No se observó por lo tanto, que la presencia de los conidios de una especie afectara la germinación de los conidios de la otra, sino que las dos especies se comportan independientemente. En los cultivares estudiados (gran enano, currare, burmanicoides) siempre fue más lento el desarrollo de *M. musicola* que de *M. fijiensis*, lo que refuerza los resultados obtenidos en campo, con respecto a que el comportamiento y desarrollo de la sintomatología de estas enfermedades está influenciado por las condiciones ambientales (temperatura mínima) de la zona donde se presentan. En condiciones de invernadero, se observó que los tubos germinativo emitidos por los conidios de *M. fijiensis* tienen la capacidad de penetrar un mayor número de estomas que *M. fijiensis*, lo cual permite que *M. fijiensis* sea más agresiva sobre los cultivares estudiados.

Los resultados de las investigaciones desarrolladas durante cuatro años, reflejan una adaptabilidad de *M. fijiensis* en zonas de altura, donde se desarrolla más rápidamente que la *M. fijiensis*, la cual esta influencia por las condiciones climatológicas de la zona, específicamente la temperatura mínima. La diversidad de clones de *Musa* sp que se encuentran en la zona estudiada, así como condiciones intermedias de temperatura permite que existan niveles intermedios donde las dos especies conviven juntas en una misma hoja. Estudios similares en diferentes cultivares de banano y plátano podrían permitir conocer más sobre los mecanismos de resistencia y sobre los mecanismos de resistencia y sobre las relaciones interespecíficas. Además con más información se podría establecer un mapa de distribución de las dos especies, que permita orientar la selección más apropiada de los cultivares que se siembren.

Control biológico de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) del banano: resultados preliminares

Elkin Bustamante, CATIE, Proyecto RENARM,
Roberto González, CATIE, Proyecto RENARM,
Phil Shannon, NRI/ODA (Reino Unido)/CATIE, KK
Unidad de Fitoprotección, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

La Unidad de Fitoprotección inició sus actividades en el control biológico de patógenos foliares en el cultivo de tomate en 1989. Antagonistas como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus cereus* fueron muy eficientes en el control de *Alternaria solani*, a nivel de laboratorio y casa de malla pero no de campo. Al considerar que otros cultivos podrían tener una arquitectura y filosfera más favorable para la interacción patógeno-antagonista se seleccionó el banano y el hongo (*M. fijiensis*) causante de la Sigatoka Negra para los estudios de control biológico.

La Sigatoka Negra es el principal problema fitopatológico que se presenta en los cultivos de banano y plátano. El uso de fungicidas se considera la táctica de control más utilizada históricamente, sin embargo la resistencia del hongo y la falta de nuevos productos, hacen necesario la disponibilidad de otras alternativas compatibles. El CATIE, desde 1993, inició estudios en el uso de control biológico de la Sigatoka Negra en banano y plátano. Los resultados iniciales a nivel de laboratorio, casa de mallas y campo, indican la eficacia de *Bacillus cereus* y *Serratia marcescens* en el control de *M. fijiensis*. Los resultados de campo no presentan diferencias significativas entre el control por fungicidas y el dado por estos microorganismos, en condiciones de alta presión de inóculo. Los microorganismos fueron aplicados sin el uso de adherentes. La multiplicación más eficiente se obtuvo en caldo nutritivo. Una aplicación de *S. marcescens* a una dosis de 10^7 indicó la permanencia de este microorganismo por más de 15 días en concentraciones superiores a 10^5 .

Un sistema de preaviso biometeorológico de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano (*Musa AAB*)

Francisco Jiménez*, Olivier Fages*, Ana Tapia*, Jean Vincent Escalant*, Nicolas Gribius*

* CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA, CATIE

7170 Turrialba, Costa Rica.

El cultivo de plátano (*Musa AAB*) es de gran importancia socioeconómica para Centro América y otros países tropicales. La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es uno de los principales factores limitantes de la producción. Los sistemas de preaviso son fundamentales en la racionalización del uso de pesticidas y de reducir los costos de producción, y por lo tanto, en garantizar la sostenibilidad ecológica y productiva de la actividad. El objetivo principal de esta actividad fue de proponer un sistema biometeorológico simple de pronóstico de la Sigatoka negra a fin de decidir el momento más oportuno de efectuar las aplicaciones de fungicida.

Después de varios estudios sobre interrelaciones entre las condiciones meteorológicas y el desarrollo de la enfermedad, llevadas a cabo en la región Atlántica de Costa Rica, se mostró que la variación temporal del nivel de infección de la hoja número cuatro (NIH4, establecido de acuerdo a la escala de Fouré), es bastante similar a la evolución de la duración acumulada de la lluvia (DLL) durante las cuatro primeras de seis semanas anteriores a la evaluación del NIH4. Estos resultados sirvieron de base para desarrollar un sistema de preaviso biometeorológico de la enfermedad, el cual es simple y tiene un carácter predictivo de dos semanas, lo que permite combatir la enfermedad en estados más sensibles a los fungicidas y por lo tanto en un momento más oportuno. Este sistema fue probado con éxito bajo las condiciones de producción de pequeño agricultor en la misma región Atlántica de Costa Rica, permitiendo mantener la plantación en buen estado sanitario y un uso racional de los fungicidas. La alternancia de fungicidas de diferente modo de acción, así como las prácticas de cultivo oportunas (principalmente la deshoja, despunta, deshija y control de malezas), se consideran parte de este sistema de preaviso.

Posteriormente se procedió a una etapa de validación-transferencia del sistema con asociaciones de productores de plátano de la Zona Atlántica de Costa Rica (Coopepalacios, Asomargarita) y a la capacitación de agentes de extensión agrícola en el uso del mismo para el manejo integrado la enfermedad. En este proceso se incluyó, además, la transferencia de la técnica de fumigación a bajo volumen con bomba de motor (13-15 litros/ha de aceite mineral más fungicida), lo que permite a los productores, la posibilidad de independizarse de las empresas de fumigación aérea, y efectuar más oportunamente los tratamientos fungicidas.

Como resultado de estas acciones, los productores adoptaron inmediatamente la fumigación a bajo volumen. En cuanto al sistema de preaviso, la experiencia mostró que es perfectamente posible implementar el mismo con pequeños y medianos productores, pero que es muy importante, además del entrenamiento inicial, la supervisión para que todas las evaluaciones, y los tratamientos si es el caso, se efectúen de acuerdo a lo establecido. En los casos que condiciones se cumplieron el sistema de preaviso mostró ser una herramienta muy importante y prometedora en la lucha razonada contra la Sigatoka negra en plátano, principalmente cuando existen normas de calidad establecidas, como es el caso del plátano de exportación. Por otra parte, las asociaciones de productores mostraron ser un medio idóneo para la implementación y uso del sistema, ya que se crea la posibilidad de que sean unos pocos de ellos los que manejan el sistema para todo el conjunto. con todas las ventajas que ello implica.

A Biometeorological forecasting system for Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) in plantain (*Musa AAB*)

Francisco Jiménez *, Olivier Fages *, Ana Tapia *, Jean Vincent Escalant *, Nicolas Gribius*

* CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA, CATIE

7170, Turrialba, Costa Rica.

Plantain crop (*Musa AAB*) is a very important socio-economic activity in Central America and other tropical countries. Black Sigatoka caused by *Mycosphaerella fijiensis* fungus is one of the main limiting factors for its production. Forecasting systems are crucial in order to rationalize pesticides use, reduce production costs, and thus guarantee the ecological and productive sustainability of this activity. The main objective of this work was to propose a simple biometeorological forecasting system for Black Sigatoka to determine the most adequate time for fungicide application.

After several studies on the interrelationships between meteorological conditions and the development of the disease, carried out in the Atlantic coast of Costa Rica, it was found out that seasonal variation of the infection level of leaf number four (NIH4, established according to Fouré scale), is similar to the evolution of rain accumulated duration (DLL) during the first four of the six weeks previous to NIH4 evaluation. These results were the basis for the development of a biometeorological forecasting system of the disease, which is simple and has a predictive character of two weeks that allows to attack the disease during its more sensible stages to fungicides. This system was successfully tested under the small farmer's conditions in the Atlantic coast of Costa Rica. It allowed to keep the plantation in good sanitary conditions and to rationalize fungicide use. Alternating fungicides with different mode actions, as well as appropriate planting practices (especially defoliation, sprouting, shooting removal and weed control), are part of this forecasting system.

Later, a validation/transfer phase of the system took place with plantain producers associations in the Atlantic coast of Costa Rica (Coopepalacios, Asomargarita) and by training to agricultural extension personnel on the use of the system for the integrated management of the disease. This process also included transfer of the low volume fungicide application technique using a motor pump (13-15 liters/ha of mineral oil plus fungicide) which offers the producers both the possibility of becoming independent from aerial fumigation companies and of applying fungicide treatments adequately.

As a result, the producers adopted low volume application techniques immediately. In regards to the forecasting system, experience showed that it is completely possible to implement it with small and medium farmers, but that initial training, supervision for all evaluations and fungicide treatments, if required, should be carried out according to what has been established. In the cases in which all conditions were met, the system proved to be a very important and promising tool against Black Sigatoka in plantain, especially when quality rules have been already established, such as in plantain for exportation. Besides, producers associations showed to be the most suitable means for this system implementation and use since it allows a few of them managing the system for the whole group, with all the advantages implied.

LAS NUEVAS PERSPECTIVAS - LES NOUVELLES PERSPECTIVES

Forest tree improvement: an overview with special reference to the potential of biotechnology

Jonathan Cornelius
CATIE / ODA

History and development of tree improvement

Genetic improvement of trees is not a new activity: In 16th century Japan, tree planters developed cultivars of *Cryptomeria japonica* (Toda, 1974), whilst the first recorded provenance test dates from 1760 (*Pinus sylvestris*, France) (Bouvarel, 1986), and the first seed orchard (*Larix*, Germany) from 1888 (Schmidt and Stern, 1974). However, it is only in the last sixty years, with the widespread adoption of industrial plantation forestry, and the development of the scientific base of genetic improvement through the establishment of population and quantitative genetic theory by Fisher, Haldane, Wright, and others, that forest tree improvement has become a routine activity wherever trees are planted on a large scale.

Methods and approaches

Methods and approaches to tree improvement are highly conditioned by three important interrelated characteristics of forest trees: they are highly genetically variable, largely undomesticated, and are usually outbreeding. Because of these three common factors, it is possible to make generalizations about the methods and approaches currently in use for the hundreds (Haines, 1994) of species currently undergoing some form of genetic improvement.

The first step: importance and utilization of population level variation

Many trees have practically continental-wide distributions (e.g. *Acacia albida* (Africa), *Eucalyptus camaldulensis* (Australia) *Populus tremuloides* (North America), *Pinus sylvestris* (Europe), *Cordia alliodora* (North, Central and South America), *Gmelina arborea* (India to Southeast Asia). Frequently, when planted in a common location, plants derived from populations from different parts of a species range show important differences (up to 700%) in growth rates, as well as large differences in other traits of economic importance, such as stem straightness. As a result, it is generally accepted that tree improvement programmes should begin with exploration and testing at the population level; there is no point in investing resources in the 'upgrading' by improvement of a suboptimal provenance so that it reaches the existing level of the best provenance.

Within-population selection: the first generation

The methods that tree breeders use at the beginning of the within-population selection process are conditioned heavily by the characteristics of the base population, particularly its large size and wild or undomesticated nature. Typically, initial base populations consist of a very large (hundreds of thousands or millions) number of trees in natural forest or unimproved plantations. It is obviously impossible to progeny-test more than a tiny proportion of the trees in the base population. Programmes normally begin, therefore, with phenotypic selection in these base populations. Through selection of 'plus-trees', forest tree breeders aim to make some modest genetic gain over the base population, and at the same time reduce this to a manageable size, without leaving behind in the forest any significant number of favourable alleles. Classically, these plus-trees are grafted into clonal seed orchards. Later, on the basis of progeny test results (seed for progeny tests can be collected directly from the plus-trees or from their grafts in the orchard), the worst clones are 'rogued' from the orchard, which will thereafter produce seed only from mating between genotypically superior individuals.

Within-population selection: subsequent generations

Many tree species have evolved mechanisms to avoid or much reduce self-pollination. As a result, trees tend to have a large genetic load (Ledig, 1986), which, on inbreeding -either selfing or biparental - can be manifested as inbreeding depression, which appears to be linearly related to the value of the inbreeding coefficient F (Griffin, 1990). This factor exerts a profound influence on tree breeding strategies, in two principal ways. First, in general, breeding through the creation of inbred lines and subsequent hybridization is not considered a practical possibility, because chronic inbreeding depression rapidly begins to affect survival and reproduction of the genotypes in question. As a consequence, long-term breeding is by recurrent selection, strategies for which, in turn, are heavily influenced by the need to manage inbreeding, and particularly to avoid inbreeding depression in seed production populations. Tree breeders have evolved and adapted three main types of long-term breeding strategy in response to this fundamental problem (White, 1992). They differ in organization and structure of the breeding population, i.e. the group of genotypes between which mating will take place to regenerate the base population for the next breeding cycle (White, 1987). It is also important to stress that, in practice, long-term breeding plans may often include elements of all three. In sublining (van Buijtenen and Lowe, 1979), the longest established system, the breeding population is permanently split into groups of typically 20-40 individuals (White, 1992). Selection is carried out exclusively within these small groups, but seed for commercial use is produced by matings between them. Thus inbreeding and, possibly, inbreeding depression, may occur within the groups, but the commercial, improved seed will be free of both. The multiple population breeding strategy (Namkoong et al, 1980) is superficially similar, in that the breeding population is split into smaller groups named subpopulations. However, subsequent management reflects the wider objectives of the strategy, which aims to maintain and even increase variation between subpopulations, which are located in different environments and/or subjected to different selection criteria. If and when inbreeding depression is manifested in a particular subpopulation, variation is restored by crossing with another similar or complementary subpopulation. Unlike sublimes, subpopulations are not 'closed'. In the third strategy, nucleus breeding, the breeding population is split into two groups: a small, elite, nucleus, and the main population. In each generation of selection, resources are concentrated on the nucleus (higher selection intensity, more progeny tests, controlled crossing), which therefore shows a faster rate of advance than the main population. Improved seed or vegetative propagules are produced from the nucleus. In each generation, the best of the main population are 'promoted' to the nucleus, whilst 5%-20% of the individuals used to regenerate the main population will be derived from the nucleus (White, 1992). This two-way gene flow avoids excessive divergence between the two groups, whilst at the same time avoiding the accumulation of excessive relatedness in the nucleus.

Clonal selection and clonal forestry

A description of current approaches to forest tree improvement would be incomplete without a mention of clonal forestry. Many forest trees can be vegetatively propagated by relatively simple techniques (Leakey et al., 1980; Talbert et al., 1993). In recent decades, clonal selection has led to spectacular increases in plantation productivity (Martin, 1986). Due to this and its many other advantages (Kleinschmit et al., 1993), there is little doubt that use of clonally selected material in forestry will continue to grow in the future. Increasingly, clones will serve as the 'delivery mechanisms' for genetic gain achieved within the strategies outlined above.

The potential of biotechnology

Biotechnology techniques can be grouped into three broad categories: those related to propagation and preservation; those based on the use of molecular markers; those related to genetical transformation. In general, the first and the third of these groups have limited current application in the tree improvement field. *In situ* or *circa situ* genetic conservation is considered to be more appropriate than *ex situ* method for forest trees (Kanowski and Boshier, 1995), whilst the cost effectiveness of tissue-culture produced plants is

likely to depend on their being used to deliver a high level of genetic superiority (Haines, 1994) that might in any case be available using simpler vegetative propagation techniques. Transformation, for a variety of reasons, is unlikely to have much short-term application to improvement of growth traits. However, although, in general, breeding for disease resistance is not a 'mainstream' activity in forest tree breeding, there are number of specific areas in which transformation offers great promise, e.g. resistance breeding in Meliaceae. Molecular genetic markers (isoenzymes, RAPDs, RFLPs, SSRs), by contrast, are widely acknowledged to have multiple applications in the forest tree improvement field. However, these applications are generally considered to be principally in the basic fields of population genetics and reproductive biology in natural forest and seed orchards (e.g. Boshier et al, 1995a, 1995b; Chalmers et al., 1992; Yeh, 1989), and in 'quality control' (Haines, 1994) in seed orchards and clonal stock (i.e. verification of genotype identities). Strauss et al. (1992) point out that, due essentially to the lack of linkage disequilibrium in most populations of forest trees, marker-aided selection in forest trees is likely to be of little short-term usefulness. A comprehensive survey of the potential of biotechnology in tree improvement is provided by Haines (1994).

Final comments

The great majority of breeding programmes in the agricultural, horticultural, and livestock sectors are involved with domesticated species. Many of these species, at least in their domesticated forms, are genetically depauperate, and to a large extent the aims and activities of genetic improvement are conditioned and constrained by haphazard and unplanned domestication, which generally took place long before the advent of scientifically-based genetic improvement. By contrast, domestication of tree species is only just beginning. Tree breeders have the opportunity to plan and execute this process scientifically and, it is to be hoped, to avoid many of the problems that plague breeding in other sectors. It is awareness of this opportunity and responsibility that has led to the careful, long-term strategic planning that underlies the best tree improvement programmes. It is, perhaps, partially a measure of tree breeders' success to date, particularly as regards conservative use of germplasm, that tree improvement still tends to be opportunity-driven (e.g. the opportunity to increase yield and quality) rather than problem-driven; in the forestry sector, breeding for resistance to pests and diseases remains a 'speciality', minority field rather than part of the mainstream activities of most tree breeders.

References

- Boshier, D.H.; Chase, M.R.; Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. *American Journal of Botany* 82(4): 476-483.
- Boshier, D.H.; Chase, M.R.; Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighbourhood, and population structure. *American Journal of Botany* 82(4): 484-490.
- Bouvarel, P. 1966. L'amélioration génétique de arbres forestiers: essai d'une histoire. *Revue Forestière Française*, special number: amélioration génétique de arbres forestiers, pp 7-11.
- Chalmers, K.J.; Waugh, R.; Sprent, J.I.; Simons, A.J.; Powell, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.
- Griffin, A.R. 1990. Effects of inbreeding on growth of forest trees and implications for management of seed supplies for plantation programmes. In Bawa, K.S. and Hadley, M. (eds). *Reproductive ecology of tropical forest plants*. UNESCO Man and the Biosphere Series, Vol. 7.
- Haines, R. 1994. *Biotechnology in tree improvement*. FAO Forestry Paper 118. Rome, 230 pp.

Hamrick, J.L. 1992. Distribution of genetic diversity in tropical tree populations: implications for the conservation of genetic resources. Pp 74-82 in IUFRO (1992), 'Resolving tropical forest resource concerns through tree improvement, gene conservation and domestication of new species', Conference proceedings, IUFRO working group S2.02.08, Cali and Cartagena, Colombia, October 8-9, 1992. CAMCORE / Smurfit Cartón de Colombia / Smurfit Cartón de Venezuela / Pizano S.A., 468 pp.

Kanowski, P.J.; Boshier, D.H. 1995. Conserving the genetic resources of trees *in situ*.

Kleinschmit, J.; Khurana, D.K.; Gerhold, H.D.; Libby, W.J. 1993. Past, present, and anticipated applications of clonal forestry. Pp. 9-41 in Ahuja, M.R. and Libby, W.J. 1993. Clonal forestry II. Conservation and application. Springer, 277 pp.

Leakey, R.R.B., Mesén, J.F., Tchondjeu, Z., Longman, A.K., Dick, J.McP., Newton, A., Matin, A., Grace, J., Munro, R.C. y Mutoka, P.N. 1990. Low-technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Commonw. For. Rev.* 69(3):247-257.

Ledig, F.T. 1986. Heterozygosity, heterosis and fitness in outbreeding plants. In: Soule (ed.), Conservation Biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer, Sunderland, MA, pp.77-104.

Martin, B. 1986. L'utilisation de clones. *Revue Forestière Française*, special number: amélioration génétique de arbres forestiers, pp 81-88.

Namkoong, G.; Barnes, R.D. y Burley, J. 1980. A Philosophy of Breeding Strategy for Tropical Forest Trees. University of Oxford. Commonwealth Forestry Institute. Unit of Tropical Silviculture. Tropical Forestry Papers No. 16. Oxford, England. 67 p.

Schmidt, W.; Stern, K. 1974. Forstgenetik und Forstpflanzen-züchtung in Deutschland. Pp 24-29 in Forest Tree Breeding in the World (Toda, R. ed.). Ryookiti Toda (publisher), Government Forest Experiment Station, Japan, 205p.

Strauss, S.H.; Lande, R.; Namkoong, G. 1992. Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Can. J. For. Res.* 22: 1050-1061.

Talbert, C.B.; Ritchie, G.A.; Gupta, P. 1993. Conifer vegetative propagation: an overview from a commercial perspective. Pp. 145-181 in Ahuja, M.R. and Libby, W.J. 1993. Clonal forestry I. Genetics and biotechnology. Springer, 277 pp.

Toda, R. 1974. Notes on the Japanese State Government Forest Tree Breeding Project. Pp. 161-169 in Forest Tree Breeding in the World (Toda, R. ed.). Ryookiti Toda (publisher), Government Forest Experiment Station, Japan, 205p.

Van Buijtenen, J.P.; Lowe, W.J. 1979. The use of breeding groups in advanced generation breeding. Pp. 59-65 in Proceedings 15th South. For. Tree Improve. Conf., June 19-21, Miss. State, MS.

White, T.L. 1987. A conceptual framework for tree improvement programmes. *New Forests* 4: 325-342.

White, T. 1992. Advanced generation breeding populations: size and structure. Pp 208-222 in IUFRO (1992), 'Resolving tropical forest resource concerns through tree improvement, gene conservation and domestication of new species', Conference proceedings, IUFRO working group S2.02.08, Cali and Cartagena, Colombia, October 8-9, 1992. CAMCORE / Smurfit Cartón de Colombia / Smurfit Cartón de Venezuela / Pizano S.A., 468 pp.

Yeh, F.C.H. 1989. Isozyme analysis for revealing population structure for use in breeding strategies. Pp 119-131 in Gibson, G.L., Griffin, A.R. and Matheson, A.C. (eds). 1989. Breeding Tropical Trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry. Proc IUFRO. Conference, Pattaya, Thailand. Oxford Forestry Institute, U.K. y Winrock International, Arlington, VA,

Genetic diversity in fragmented and managed tropical rain forest ecosystems: basic principles and research opportunities at CATIE

Bryan Finegan and José Joaquín Campos
CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica

The earth's biodiversity is currently being altered and degraded at a rate never before attained during evolutionary history. The greater part of the biodiversity losses are occurring in tropical forests, which, although they cover barely 7% of the earth's surface, house perhaps 50-90% of total biodiversity.

It is estimated that 17 million hectares of tropical forest are destroyed each year. At that rate, between 5 and 10% of the species of tropical forests may become extinct in the next 30 years. It is widely recognised that the principal cause of tropical deforestation is the expansion of the agricultural frontier, driven by cultural attitudes and policies of tenure and use of land which confer little value on the natural forest.

Among its many consequences, habitat alteration and destruction creates a serious threat to the genetic diversity of forest organisms. Globally, it is estimated that 492 genetically distinct populations of tree species are currently endangered. In regions like Central America, in which a significant part of the remaining forests are degraded and fragmented by human intervention, the risk of dysgenic tendencies in populations of forest tree species may be particularly serious.

In spite of the urgent necessity to conserve the biodiversity of tropical forests, conservation measures have not yet met with unqualified success, due mainly to the fact that the benefits are widely perceived to be 'public'. In the face of this problem, the World Biodiversity Conservation Strategy sets out three basic elements for biodiversity conservation: save biodiversity, study it and use it equitatively. Within this latter framework, the management of natural forests - based on techniques which minimise the effects of the harvesting of forest products on ecosystem function and biodiversity - could and should be an effective method for the conservation of biodiversity through its equitative use, especially for privately owned forests. CATIE is a regional leader in research and development work on natural forest management by and for forest owners in Tropical America. In the context of the increasingly fragmented and disturbed forests of tropical America, a truly scientific basis for sustainable natural tropical forest management - the development of which is one of CATIE's major objectives - must eventually include knowledge of the impacts, at the genetic level, of both forest fragmentation and of the harvesting of different products.

The main objectives of this paper are, therefore, to introduce CATIE's research on the management of natural forests, to draw attention to the urgent necessity to complement that research with forest genetic studies, and to identify opportunities for collaboration in such research.

Much of the forest available for management is characterised by a high level of fragmentation and, of course, by a history of human intervention within fragments. The genetic effects of forest fragmentation may include (Young, 1995):

- the 'sampling effect' on the genetic constitution of populations in forest fragments, due to non-random patterns of forest clearance and spatial genetic structure in individual species populations;
- formation of genetic bottlenecks;
- alteration of patterns of gene flow, mating and selection.

The genetic effects of the selective harvesting of timber products still usually practised in tropical rain forests are less clear and have yet to be quantified, but may include selection for genotypes of lower quality from the commercial point of view (the oft-cited dysgenic selection) and increased inbreeding (Ledig, 1992; Murawski et al., 1994). As forms of selective harvesting are enshrined in guidelines for the sustainable

management of tropical rain forests, the need for study of their genetic effects is clear.

CATIE's Unit of Natural Forest Management is currently consolidating its network of Key Sites for long-term research on ecological, silvicultural and operational aspects of natural forest management. Each site offers the following to collaborating researchers:

- research area consisting of forest managed for timber production under strict guidelines for sustainability;
- large, intensively studied permanent sample plots in which forest response to management is documented in terms of growth, yield, natural regeneration and plant species biodiversity; easy access and guaranteed security.

CATIE currently manages five such Key Sites, all of them in Costa Rica and embracing primary and secondary forests in both tropical lowland and montane environments. In the near future, it is hoped to add Key Sites in Nicaragua and Guatemala to this network, and in the medium term, sites in the Amazon basin will also be incorporated. In the area of collaborative research on tree genetic resources, preliminary contacts with the World Conservation Monitoring Centre have been made and information exchanged. Major questions on forest genetic resources remain to be answered, however, among them the following:

- what effects do forest fragmentation and/or selective harvesting have on the viability of tree species populations?
- what is the value of fragmented and/or managed forests for the *in situ* conservation of genetic resources of crop species such as *Annona* spp. or cacao?
- can forest management techniques be developed which minimise the genetic degeradation of populations of commercial species in managed forests, and which optimise the value of fragmented and/or managed forests for *in situ* conservation?

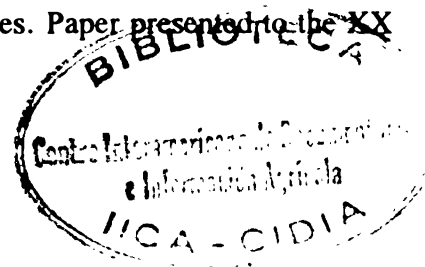
We now invite participants in this Symposium to contact us with a view to developing joint research proposals in this exciting and vitally important field.

Literature cited

Ledig, F.T. (1992) Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. **Oikos** 63, 87-108.

Murawski, D.A., Gunatilleke, I.A.N.M., Bawa, K. (1994) The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. **Conservation Biology** 8, 997-1002.

Young, A. (1995) Forest fragmentation: effects on population genetic processes. Paper presented to the XX IUFRO World Congress, Tampere, Finland, August 1995.



Geographic Information Systems and Remote Sensing in CATIE.

Grégoire Leclerc

Geographic Analysis Laboratory

Watershed and Agroforestry Systems Area, CATIE

tel:506-556-1530

fax:506-556-1576

Internet:gleclerc@computo.catie.ac.cr

Geographic Information Systems (GIS) and Remote Sensing have extremely diverse applications. From natural resources management to the actualization of thematic maps, they also find an use in market analysis and automatized navigation. Now the enormous potential of these tools is being realized for land use monitoring and land evaluation in a socioeconomic and environmental context. Since 1987, CATIE have been involved in GIS and Remote Sensing activities applied to agriculture and natural resources management. In this communication we present an overview of the research activities that have been performed in CATIE, which include probabilistic studies of cloudiness, critical areas determination, classification of satellite imagery, radar remote sensing, land evaluation, gradient analysis, climate interpolation, disease monitoring, agroforestry and riparian buffers, forest inventory, soil erosion and landslides. Also will be described some examples of applications with a commercial potential.

Los Sistemas de Información Geográfica y la Teledetección en el CATIE.

Grégoire Leclerc

Geographic Analysis Laboratory

Watershed and Agroforestry Systems Area, CATIE

tel:506-556-1530

fax:506-556-1576

Internet:gleclerc@computo.catie.ac.cr

Los sistemas de información geográfica y la teledetección tienen aplicaciones en campos extremadamente diversos. De la gestión de los recursos naturales y la actualización de mapas temáticos, se usan también al análisis de mercados y a la navegación automatizada. Ahora se esta realizando el enorme potencial de estas herramientas para el monitoreo de los cultivos y la evaluación de tierras en un contexto socio-económico y ambiental. Desde 1987 que el CATIE esta involucrado en actividades de SIG y de Teledetección aplicados a la agricultura y a la gestión de los recursos naturales, se han logrado algunos avances que presentamos en esta comunicación. Vale mencionar estudios de evaluación probabilística de la nubosidad, definición de áreas críticas, clasificación de imágenes de satélite, teledetección por radar, evaluación de tierras, análisis de gradientes, interpolación de superficies de clima, monitoreo de plagas, agroforesteria, foresteria, erosión de suelos y deslizamientos de tierra. También se describen ejemplos exitosos que se podrían repetir y que tienen un potencial comercial indiscutible.

Lista de Participantes/ Liste des Participants/ List of Participants

Anthony François
ORSTOM, CATIE, Costa Rica

Auboiron Eric
CRBP, Cameroun

Astorga Carlos
CATIE, Costa Rica

Bakry Frédéric
CIRAD-FLHOR, Guadeloupe

Bertrand Benoît
CIRAD-CP/ICAFE, Costa Rica

Bustamante Elkin
CATIE, Costa Rica

Carlier Jean
CIRAD-FLHOR, France

Campos J.J.
CATIE, Costa Rica

Christophe Guy
MAE-DRCST, Costa Rica

Coppens Geo
IPGRI, CIAT, Colombia

Cote François
CIRAD-FLHOR, France

Cornelius J.
CATIE, Costa Rica

Dufour Magali
CIRAD-CP, CATIE, Costa Rica

Escalant Jean-V
CIRAD-FLHOR/CATIE,
Costa Rica

Espinoza Ana M.
UCR, Costa Rica

Filloux Denis
CIRAD-CA, Guadeloupe

Finegan Brian
CATIE, Costa Rica

Fouré Eric
CRBP, Cameroun

Ganry Jacky
CIRAD-FLHOR, France

Guideroni E.
CIRAD-CA, France

Gonzales Roberto
CATIE, Costa Rica

Guevara Rubén
CATIE, Costa Rica

Jaramillo Ramiro
INIBAP-LAC, Costa Rica

Jenny Christophe
CIRAD-FLHOR, Guadeloupe

Jimenez Francisco
CATIE, Costa Rica

Kerbelec F.
CIRAD-FLHOR, Guadeloupe

Laboucheix Jean
CIRAD-LAC, Costa Rica

Lagoda Pierre
CIRAD-FLHOR, France

Leclerc Grégoire
CATIE, Costa Rica

Lepoivre Philippe
Faculté des Sciences
Agronomiques
de Gembloux, Belgium

Lescot Thierry
CIRAD-FLHOR, CATIE,
Costa Rica

Marikis Alvarez Nick
CATIE, Costa Rica

Mourichon Xavier
CIRAD-FLHOR, France

Phillips Wilbert
CATIE, Costa Rica

Rabot Béatrice
CIRAD-FLHOR, CATIE,
Costa Rica

Raquin Christian
CNRS, France

Riveros Angarita
Universidad de Tolima, Colombia

Schwendiman J.
CIRAD-BIOTROP, France

Schoofs Hilde
Katholic University of Leuven,
Belgium

Tapia Ana C.
UCR, Costa Rica

Teisson Claude
CIRAD-BIOTROP, France

Tezenas Du Montcel
CIRAD-FLHOR, France

Tomekpe Kodjo
CRBP, Cameroun

Vasquez Nelly
CATIE, Costa Rica

Coordinación: Jean-Vincent Escalant; Nelly Vasquez
Coordination

Edición: Jean-Vincent Escalant
Edition

Levantado de texto: Gonzalo Valverde
Levéé de texte

Diseño de portada: Domingo Loaiza
Dessin de couverture

Impresión: Unidad de Producción de Medios, CATIE
Impression

Edición de 100 ejemplares
Edition de 100 exemplaires

Imprimido: noviembre 1995
Imprimer