

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y

ENSEÑANZA (CATIE)

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

ÁREA DE POSGRADO

USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES RAPDs PARA EVALUAR LA  
DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE CAFÉ *Coffea arabica* L.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico de Postgrado y Capacitación del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por :

AIDA VANESSA WILCHES MORALES


Turrialba, Costa Rica

1995

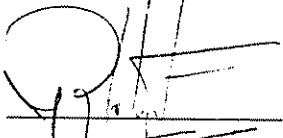
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

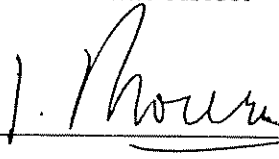
FIRMANTES:

  
Francis Anthony

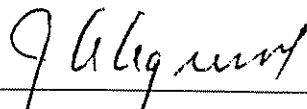
Profesor Consejero

  
Rodolfo Salazar

Miembro Comité Asesor

  
Jorge A. Morera

Miembro Comité Asesor

  
J. A. Aquino

Jefe, Area de Postgrado

  
Pedro Ferrer

Director, Programa de Enseñanza



Candidato

## DEDICATORIA

A Ricardo y Gloria, por su apoyo, confianza y por su espera durante este tiempo,

A Paola, Carolina y Cleito por su cariño y su alegría,

A François, por todo su cariño,

A Lilly, Martha y Blanca por toda la amistad,

A Isabel, Ernesto y Javier por más y más amistad.

## AGRADECIMIENTOS

Al gobierno de Holanda por la oportunidad de estudiar una maestría y confiar en los estudiantes latinoamericanos,

A mi consejero, François Anthony, muy especialmente por aportar todos sus conocimientos, su experiencia, profesionalismo e interés, siempre y desinteresadamente. Por buscar siempre lo mejor para el trabajo y por permitirme aprender tantas cosas,

A Jorge Morera por pertenecer a mi comité de tesis y especialmente por su amistad, eterna confianza y por transmitir siempre tranquilidad y ánimo,

A don Rodolfo Salazar por sus aportes, su confianza y por su paciencia,

A todos los compañeros de mi promoción que hicieron de estos dos años una buena estadía: especialmente a los venezolanos y los brasileños,

A mis paisanos: Jorge, Mauricio y a la familia Bustamante (Elkin, Edith, Angie y Paulita) por el calor humano,

A Olman Quirós muy especialmente, por su invaluable ayuda dentro del laboratorio, por su alegría durante el trabajo y a todo el personal del laboratorio de Cultivos de Tejidos, Quitos (1 y 2), William, Willy, Juan (1 y 2), a Maritza y a Nelly.

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
TABLA DE CONTENIDO .....	v
RESUMEN .....	vii
SUMMARY .....	viii
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISION DE LITERATURA .....	4
2.1 Antecedentes sobre la introducción de café en América .....	4
2.2 Colección de germoplasma de <i>C. arabica</i> del CATIE .....	6
2.3 Mejoramiento genético del café .....	7
2.4 Apoyo de la Biología Molecular al mejoramiento de café .....	9
2.4.1 Los marcadores RFLP .....	9
2.4.2 Los marcadores RAPDs .....	10
2.4.3 Comparación entre RFLP y RAPDs .....	13
2.4.4 Uso de los RAPDs en especies cultivables .....	14
3. MATERIALES Y METODOS .....	17
3.1 Recolección del material vegetal .....	17
3.2. Aislamiento de ADN .....	21
3.3 Verificación de la calidad de ADN .....	21
3.4 Cuantificación del ADN .....	23
3.5 Amplificación del ADN (RAPDs) .....	24

3.6	Análisis de datos .....	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSION .....	28
4.1	Caracterización fenotípica de los individuos .....	28
4.2	Resultados del aislamiento de ADN .....	32
4.3	Protocolo usado para la amplificación de los RAPDs .....	35
4.4	Análisis del polimorfismo del material silvestre .....	37
5.	CONCLUSIONES .....	49
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	51
	<b>ANEXOS</b> .....	57
	ANEXO 1 .....	57
	ANEXO 2 .....	59
	ANEXO 3 .....	60
	ANEXO 4 .....	63

## RESUMEN

Las variedades de café que se cultivan en latinoamérica se derivan de una base genética muy estrecha. Prueba de esto son la alta susceptibilidad que presentan a nuevas plagas y enfermedades y la baja adaptabilidad a nuevas condiciones de cultivo. El programa de mejoramiento regional creado por el convenio IICA - PROMECAFE - CATIE y la Cooperación Francesa pretende crear una nueva base genética que permita introducir nuevas adaptabilidades conservando las propiedades favorables actuales como son: alta productividad, buena calidad, bajo porte y resistencia a la roya. El CATIE posee una de las colecciones más completas de *C. arabica* en el mundo, pero se requiere de una previa caracterización de los recursos conservados para luego ser utilizados.

El presente trabajo se hizo con los objetivos de caracterizar parte del material silvestre introducido en CATIE y caracterizar a los progenitores del material cultivado utilizando los marcadores moleculares RAPDs. Se escogieron 54 individuos representativos del material colectado por el ORSTOM y 14 procedencias representando los principales tipos de material cultivado que existen. Se obtuvieron cantidades muy variables de ADN (40 -560 ng/ml de muestra), lo cual no estuvo relacionado con el origen del material. Se probaron 4 primers con el material silvestre y se encontraron 6 RAPDs polimórficos que dieron lugar a la formación de 3 grupos aparentemente. En el material cultivado, se encontró polimorfismo en 2 primers de 26 probados. Estos resultados confirman que se debe continuar la búsqueda de nuevos primers que permitan confirmar los grupos formados dentro del material silvestre y completar la caracterización del material cultivado conservado en el germoplasma del CATIE.

## SUMMARY

The varieties of coffee grown in Latin America are derived from a very narrow genetic base. Proof of this is the high susceptibility they show to new pests and diseases and low adaptability to new cropping conditions. The regional breeding program created by the IICA-PROMECAFE-CATIE agreement and French Cooperation attempts to create a new genetic base which will permit the introduction of new adaptabilities while conserving the present favorable properties such as: high productivity, good quality, low stature and resistance to coffee rust. CATIE possesses one of the most complete collections of *C. arabica* in the world, but it requires a prior characterization of the resources in conservation to be used later in breeding programs.

This study was conducted to evaluate available genetic diversity in part of the wild material introduced at CATIE and characterize parents of cultivated material using RAPD markers. Fifty-four representatives of the material collected by ORSTOM and 14 examples representing the principal types of cultivated material that exist were chosen. Varied amounts of DNA (between 40 and 560 ng/ml) of sample) were obtained, which was not related to the material origin. Four primers and six polymorphic RAPDs were found within the wild material which, in turn, formed three apparent groups. Polymorphism was found in two primers of the 26 cultivated materials tested which confirms the narrow genetic base of cultivated varieties. Results confirm that the search of new primers which allow us to confirm groups formed in wild material and complete the characterization of cultivated material conserved at CATIE must continue.



## LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro 1.</u> Material vegetal de <i>C. arabica</i> recolectado en CATIE para el estudio.....	18
<u>Cuadro 2.</u> Caracterización fenotípica de las introducciones de CATIE estudiadas y su relación con el árbol escogido en Turrialba, Costa Rica.....	29
<u>Cuadro 3.</u> Rendimiento de la extracción de ADN para los individuos de <i>C. arabica</i> del estudio en CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	33
<u>Cuadro 4.</u> Concentraciones y cantidad de reactivos para la amplificación de los RAPDs en CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	36
<u>Cuadro 5.</u> Primers probados con el material cultivado de <i>C. arabica</i> en CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	45

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u> Generación de los RAPDs.....	12
<u>Figura 2.</u> Verificación de la calidad de ADN con electroforesis en gel.....	22
<u>Figura 3.</u> Amplificación de 17 muestras de material silvestre con el primer N-20. CATIE, 1995.	38
<u>Figura 4.</u> Patrón de amplificación mostrado con el primer X-9 dentro del material silvestre. ....	40
<u>Figura 5.</u> Grupos genéticos de café silvestre según los análisis de distancias genéticas. CATIE,1995.....	41
<u>Figura 6.</u> Polimorfismo dentro del material cultivado mostrado por el primer UBC-203.....	46
<u>Figura 7.</u> Polimorfismo dentro del material cultivado revelado por el primer UBC-253.....	47

## 1. INTRODUCCIÓN

La especie de café más cultivada en el mundo es *Coffea arabica*, originaria de las regiones montañosas de Etiopía y cultivada principalmente en las regiones de altura en América Latina. Se caracteriza por ser la única especie alotetraploide ( $2n=44$ ) dentro del género *Coffea sp.* y por tener una auto-compatibilidad entre 85-90%. Los métodos de mejoramiento basados en la autogamia, llevaron a la creación de cultivares relativamente homogéneos que fueron diseminados por todos los países productores de café en América Latina.

A pesar de sus buenas características de productividad y rendimiento, las variedades se mostraron muy susceptibles a plagas, como la roya que atacó inicialmente a los países centroamericanos. Con el surgimiento de la roya *Hemileia vastratix*, inicia sus actividades PROMECAFE<sup>1</sup> constituida por una red de los países de América Central, bajo coordinación del IICA<sup>2</sup>. Los trabajos de mejoramiento de PROMECAFE en el CATIE (1980) condujeron a la liberación de las variedades PROMECAFE 1 y PROMECAFE 2 que mostraron propiedades de resistencia a la roya y una buena alternativa para los productores de café de la región (Osorto, 1991).

En años posteriores la caficultura fue amenazada por nuevas plagas y enfermedades que no existían en la región (broca) o que no tenían tanta incidencia (nematodos, ojo de gallo, cochinillas de las raíces); y por una enfermedad muy grave que existe en Africa: el CBD (Coffee Berry Disease) o la antracnosis de frutos causado por el hongo *Colletotrichum coffeanum*. El problema de las plagas y los precios del mercado hacen que los pequeños y grandes caficultores no tengan otra alternativa diferente a la de aumentar el uso de los plaguicidas, nematicidas y fungicidas lo cual está ocasionando un problema al medio ambiente. Por lo tanto, se requiere la implementación urgente

---

<sup>1</sup> Programa cooperativo regional para el desarrollo tecnológico y modernización de la caficultura en México, Centroamérica, República Dominicana y Jamaica.

<sup>2</sup> Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura.

de mecanismos de control de plagas menos químicos y más biológicos que garanticen la preservación sostenible del medio ambiente.

La importancia y utilización de los recursos genéticos de café empezó en CATIE alrededor de los años 50. Más tarde y con base en una evaluación netamente fenotípica y de productividad del material, el convenio CATIE-PROMECAFE inició programas de selección y mejoramiento de las variedades cultivadas. Hasta ahora la diversidad conservada por la Unidad de Recursos Genéticos del CATIE ha sido poco utilizada en los programas de mejoramiento, debido a una reducida caracterización de los individuos (Anthony et al, 1993a).

A partir de 1994 se establece un programa regional para el mejoramiento genético de *C. arabica* y la creación de una nueva base genética, con la participación de PROMECAFE, el CATIE y la Cooperación Francesa (CIRAD<sup>3</sup>, ORSTOM<sup>4</sup> y el MAE<sup>5</sup>). El programa pretende aumentar la base genética del material cultivado utilizando la variabilidad del material silvestre recolectado en el área de origen de la especie *C. arabica*. Esta especie por ser alotetraploide no puede ser caracterizada utilizando métodos morfofisiológicos y bioquímicos como el análisis de isoenzimas, sino que requiere de análisis basados directamente en el ADN que proporcionan los marcadores moleculares. El trabajo de investigación que se realiza en la Unidad de Biotecnología del CATIE permite evaluar la diversidad genética de los recursos utilizando marcadores moleculares.

---

<sup>3</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

<sup>4</sup>Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement et Coopération.

<sup>5</sup>Ministerio de Asuntos Extranjeros de la República Francesa.

Considerando los aspectos mencionados anteriormente el trabajo de tesis se fundamenta en dos tipos de hipótesis:

- Existe cierta variabilidad genética dentro de la especie *C. arabica* que puede ser demostrada con marcadores moleculares (Hipótesis científica).

- Los marcadores moleculares RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) permiten distinguir grupos genéticos, procedencias dentro de esos grupos e individuos dentro de las procedencias (hipótesis metodológica).

Con los antecedentes anteriormente descritos el presente estudio pretende: Evaluar la diversidad genética de parte de la colección de café que se encuentra disponible en el banco de germoplasma del CATIE, para mejorar el uso racional de los recursos genéticos y la caracterización de las procedencias del material cultivado conservadas en CATIE.

Para lograr lo anterior se plantearon dos objetivos específicos: revelar los grupos genéticos que se encuentran en el material silvestre de la colección del CATIE y caracterizar los padres de las variedades liberadas y cultivadas, utilizando marcadores moleculares.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes sobre la introducción de café en América

El inicio de la dispersión de semillas de café hacia el continente americano se remonta a los siglos XVIII y XIX. Antes, en el siglo XIV semillas de café cultivadas en Etiopía fueron llevadas a Yemén por los árabes. De allí, en 1616, una planta de café es transportada hacia Amsterdam. En 1714, Amsterdam le ofrece al rey de Francia como regalo una planta proveniente de esta primera introducción. Más tarde, en 1720 con los viajes comerciales entre Europa y América, semillas de esa planta fueron llevadas a la Guyana Francesa, entonces colonia de Francia, de donde fueron dispersadas nuevas semillas hacia América del Sur (1723-1852), las antillas del Caribe y América Central y México. Otras semillas llegaron a América desde Amsterdam hacia la Guyana Holandesa pero provenientes de la misma base genética (Berthaud y Charrier, 1988). En el siglo XVIII, semillas de *C. arabica* o *Typica* como se conoce también, llegaron a la isla Bourbon donde se diferenció la variedad Bourbon; lo cual indica que estos dos morfotipos de *C. arabica* tienen solamente alrededor de 200 años de diferenciación.

De los dos morfotipos de *C. arabica* (*Typica* y *Bourbon*) se derivan las variedades que se cultivan actualmente en el continente americano. Ha sido ampliamente cultivada la variedad Caturra, que se caracteriza por tener una mutación que reduce la longitud de los entrenudos dándole a la planta una forma compacta. Las variedades cultivadas como Caturra se caracterizan por tener además de un porte bajo, alta productividad y resistencia a la roya; sin embargo, los buenos rendimientos se obtienen sólo bajo alto nivel de intensificación. Estas variedades presentan gran susceptibilidad a plagas y enfermedades nuevas, además de poca adaptación a distintos tipos de

suelos. Los problemas de plagas se controlan actualmente aumentando el uso de pesticidas, fungicidas y nematocidas los cuales causan daño al medio ambiente y aumentan los costos de producción. Esto hace que la caficultura deje de ser sostenible y además muy débil económicamente cuando disminuyen los precios de café en el mercado.

El estrecho origen de estas variedades muestra que el café Arabica cultivado en el continente americano contiene sólo una pequeña proporción de la variabilidad genética potencial disponible en el acervo genético del café, ya que se caracteriza por una base genética fundamentada en un número muy limitado de árboles (menos de 10 individuos originales). Y es sobre esta base genética estrecha que hasta los años 80 se implementaron programas de mejoramiento de las variedades cultivadas, lo cual hace que el trabajo de selección se vea enormemente limitado.

En 1927, se descubre el Híbrido de Timor, resultado del cruce interespecífico natural entre *C. arabica* y *C. canephora* (Goncalves y Rodrigues, 1976), a partir de esta fecha se inician trabajos de investigación con este nuevo material. Como resultado de retrocruces naturales entre las dos especies progenitoras, se ha observado que las descendencias de este Híbrido conservan características morfológicas de *C. arabica*, además combinan importantes resistencias a la roya, nemátodos y al CBD provenientes de los genes de *C. canephora*. Esto ha hecho que el Híbrido de Timor haya sido utilizado ampliamente como fuente de resistencia en programas de mejoramiento de café en todo el mundo. Existen otras variedades conocidas como los Catimores (cruces del Híbrido de Timor con la variedad Caturra), como la variedad Colombia que resultó del cruce de la población 1343 del Híbrido de Timor y Caturra; y los Sarchimores (resultado de cruces del Híbrido de Timor con la variedad Villa Sarchi de Costa Rica).

Para ampliar la base genética de café se requiere de variedades que conserven las características de porte bajo, alta productividad y calidad cercanamente igual a las variedades actuales (Caturra, Catuai, Catimor), así como resistencia a la roya anaranjada equivalente a la de los Catimores y mayor resistencia a los nemátodos y a la antracnosis de los frutos. Para tal efecto el proyecto PROMECAFE, CATIE y la Cooperación Francesa busca hacer una evaluación genotípica y fenotípica de la diversidad genética presente en parte del germoplasma del CATIE.

## 2.2 Colección de germoplasma de *C. arabica* del CATIE

Los recursos genéticos están constituidos por todos los individuos que permiten intercambio genético. En el caso de *C. arabica* están incluidos el material silvestre, los dos morfotipos principales, el Híbrido de Timor, sus descendencias, así como los cruces y mutantes que se derivan de ellos y otras especies de *Coffea sp.* El CATIE posee una de las colecciones de *C. arabica* más completas del mundo para esta especie (Osorto, 1991). Contiene numerosas introducciones de genotipos silvestres o sub-silvestres recolectados en Etiopía por la FAO y el ORSTOM, variedades y mutantes aislados en varios centros de investigación y fincas, e individuos y descendencias seleccionados por su resistencia a la roya (Morera et al., 1993). El germoplasma de *C. arabica* del CATIE proviene de varios países de América Central, América del sur (Brasil, Colombia); Africa (Etiopía, Camerún, Kenia, Malawi, Congo); e India. Existen 450 introducciones de material silvestre de las 500 colectadas por la FAO; de las cuales, aproximadamente una tercera parte del material está constituido por árboles silvestres y dos terceras partes por árboles colectados en fincas (FAO, 1968). De las introducciones del ORSTOM existen 60 procedencias en CATIE provenientes de material introducido en Camerún (Charrier, 1978). Se encuentran introducciones de las descendencias del Híbrido de Timor 1343 o líneas de la variedad Colombia; las progenies resultantes del Híbrido de Timor 832/1 (los Catimores) y la 832/2 (los Sarchimores), entre otras poblaciones que no son utilizadas actualmente en programas de mejoramiento.



En la colección del CATIE se encuentran numerosas introducciones múltiples como es el caso de la variedad Maragogipe. De esta variedad proveniente del Brasil, se encuentran dos introducciones de Guatemala, dos de Colombia, una de Puerto Rico, una de Brasil e inclusive una de Malawi (Africa) sumando un total de 41 accesiones. Las introducciones múltiples por variedad, especialmente en material homocigótico, ha hecho que se conserven en la colección numerosas duplicaciones. Falta de datos en el momento de coleccionar el material, posibles errores en la siembra de semillas y recolecciones de semilla en árboles expuestos a flujo genético, ha hecho que dentro de la colección del CATIE se encuentren plantas fuera de tipo. Dándose también el caso opuesto de encontrar pocos o ya ningún individuo de otras introducciones. Estos factores aumentan el costo de conservación de los bancos de germoplasma ya que mantiene muchas duplicaciones del mismo material y en parte limita el uso de los recursos genéticos en programas de mejoramiento lo cual justifica ampliamente una caracterización del material que se conserva actualmente en CATIE.

### 2.3 Mejoramiento genético del café

Los métodos de mejoramiento tradicionales se basan en la selección de individuos superiores escogidos a partir de la progenie de un cruce de tipo sexual. Esta selección se hace con base en el fenotipo, por ejemplo el vigor de la planta, la apariencia general, y en caracteres cuantitativos como el rendimiento y la composición química del fruto. La eficiencia de esta selección basada en caracteres fenotípicos puede ser influenciada por factores medioambientales y por la complejidad de la herencia de caracteres poligénicos.

Actualmente, los programas de mejoramiento en café buscan combinar propiedades de resistencia presentes en el Híbrido de Timor con la buena productividad y especialmente la calidad de los genes de *C. arabica*. En muchos centros de investigación del mundo las propiedades de resistencia a los nemátodos, roya (Leguizamón, 1983) y al CBD (antracnosis de frutos) han sido

ampliamente demostradas tanto en las líneas puras del Híbrido como en sus descendientes los Catimores (Carvalho, 1988; Anzueto, 1993; Aguilar et al., 1995).

La variación genética de café ha sido analizada utilizando datos de distribución geográfica, observaciones citológicas, datos taxonómicos, características agro-morfológicas y bioquímicas. Se ha demostrado que existe una relación entre la cantidad de ácidos clorogénicos, cafeína y otros compuestos químicos, con el origen biogeográfico de algunas especies de *Coffea sp.* (Anthony et al., 1993b; Rakotomalala et al., 1993). La expresión de marcadores morfofisiológicos depende directamente de las condiciones del medio ambiente y al estar sujetas a cambios, no constituyen una herramienta segura para una buena caracterización del germoplasma.

Muchas de las limitaciones de una selección basada en el fenotipo pueden ser disminuidas por la selección directa usando marcadores moleculares. Un marcador molecular de ADN es una representación de un gen en particular que se cosegrega con los genes de interés (Rafalski et al., 1991). Los primeros trabajos de caracterización a nivel molecular realizados en café se hicieron isoenzimas.

Las isoenzimas son proteínas que pueden presentar formas estructurales diferentes. Si se colocan en un medio apto (gel de almidón, agarosa o poliacrilamida) dentro de un campo de migración se pueden separar las diferentes formas de la enzima. La separación se hace de acuerdo con el peso molecular y la carga eléctrica que posean, estableciendo diferencias en la composición química de los individuos. Sin embargo, los ensayos están limitados por el número de loci polimórficos detectados en el caso de la especie tetraploide *C. arabica*. En las especies tetraploides se observa cúmulos de bandas de las dos especies padres, sin mucha variación entre los dos individuos. Por lo tanto, el índice de polimorfismo encontrado con este método es muy bajo para

esta especie en comparación con otras especies de *Coffea sp* (Berthou y Trouslot, 1977); lo cual contrasta con el nivel de variación morfológica que existe dentro del germoplasma (Louarn, 1978).

El análisis con electroforesis de isoenzimas es muy eficiente para evaluar la diversidad de las especies diploides, pero no para las especies tetraploides como es el caso de *C. arabica*. Los estudios acerca de la estructura de la diversidad genética y de las relaciones filogenéticas no han sido totalmente esclarecidos especialmente para esta especie.

#### 2.4 Apoyo de la Biología Molecular al mejoramiento de café

El desarrollo de la biología molecular constituye una alternativa para la detección de polimorfismo, tanto en café como en otras plantas de interés utilizando marcadores moleculares. Así, las nuevas técnicas que utilizan marcadores moleculares permiten determinar variabilidad genética en los bancos de germoplasma; desarrollar mapas de ligamiento genético e identificar genes específicos con el fin de rastrear su flujo en los programas de mejoramiento (Ramírez et., al 1991). Existen muchos marcadores moleculares pero los dos más conocidos y utilizados en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE son los RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimórficas) y los RAPDs (ADN Amplificado al azar).

##### 2.4.1 Los marcadores RFLP

Los RFLPs son fragmentos de ADN que se ligan a cadenas cortas de nucleótidos para luego hacer hibridación con el ADN de interés previamente digerido y ver si existen similitudes entre la cadena de ADN conocida y alguna porción del genoma de la planta estudiado (Tanksley et al,

1989). Los RFLP permiten el uso de un gran número de marcadores y los patrones pueden determinarse en el ADN extraído en cualquier época de la vida del organismo. Se utilizan en pruebas para varias especies, permiten la detección de alelos codominantes, son de herencia mendeliana estable y requieren del conocimiento de la secuencias de ADN que se están utilizando (Waugh y Powell, 1992). Estos marcadores se han utilizado para establecer relaciones filogenéticas entre poblaciones y especies de plantago, de arroz y en variedades de cucurbitáceas, entre otros (Cros et al., 1993). En cacao (*Theobroma cacao*) se utilizaron para hacer una mapa de ligamiento genético de la especie (Rodríguez, 1992; Crouzillat et al., 1994).

En café fueron utilizados para establecer similitudes con variedades de angiospermas y otras Rubiaceas usando el genoma del cloroplasto que mostró estar altamente relacionado con ambas y permitió obtener información filogenética (Cros et al, 1993). Este procedimiento presenta algunas desventajas ya que se consume mucho tiempo, requiere de gran cantidad de ADN (2-10 µg) relativamente puro y copias específicas de ADN; mucha labor y es altamente costoso (Waugh y Powell, 1992).

#### 2.4.2 Los marcadores RAPDs

En 1990 dos grupos de investigación independientemente describieron un ensayo nuevo de polimorfismo a nivel del ADN utilizando el principio de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). El grupo de DuPont Co. lo llamó ensayo de RAPD (Técnica del ADN amplificado al azar) y el otro grupo del Instituto de Investigación Biológica de California (Welsh y McClelland, 1990) llamó al ensayo AP-PCR (Amplificación al azar - de la reacción en cadena de la polimerasa).

La PCR aumenta regiones específicas del genoma para ser amplificada selectivamente *in vitro*. Requiere de un fragmento de ADN corto con secuencias terminales conocidas y 2 cadenas cortas de

secuencia conocida llamadas “primers” o iniciadores, que se unen a secuencias complementarias del ADN de interés. Contiene además una enzima termoestable (Taq polimerasa) que permite la amplificación de los productos formados, oligonucleótidos libres para la síntesis de las cadenas complementarias y otros reactivos necesarios para la reacción de amplificación.

La única diferencia que presenta la técnica de RAPDs, es que utiliza solamente un primer de secuencia conocida, conservando los demás reactivos y los principios de amplificación de la PCR. La mezcla de reactivos es sometida a ciclos de temperatura que involucran tres pasos principales. El primer paso es la desnaturalización del ADN que ocurre entre 93-95°C, luego ocurre la unión con el primer a 35°C y luego la síntesis de la cadena complementaria a 72°C. Estos tres pasos constituyen un ciclo completo de amplificación el cual se repite entre 40 y 50 veces bajo condiciones que semejan las que ocurren en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) logrando la amplificación exponencial de varios fragmentos de ADN (Innis et al., 1990).

Los productos de reacción son separados en geles de agarosa o poliacrilamida, teñidos con una solución de bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Los fragmentos amplificados son altamente dependientes a la secuencia del primer y a la secuencia del ADN estudiado. Los primers que difieren por un sólo nucleótido ADN como resultado diferentes bandas, o sea diferentes fragmentos amplificados (Figura 1). En este caso hipotético existe una diferencia en la composición de ADN revelada en las plantas A y B lo cual se traduce como polimorfismo entre las dos especies estudiadas.

Así, la amplificación de ADN con secuencias azarosas de primers (RAPDs) es un método altamente sensitivo para descubrir polimorfismos distribuidos azarosamente en el genoma (Rafalski et al., 1991).

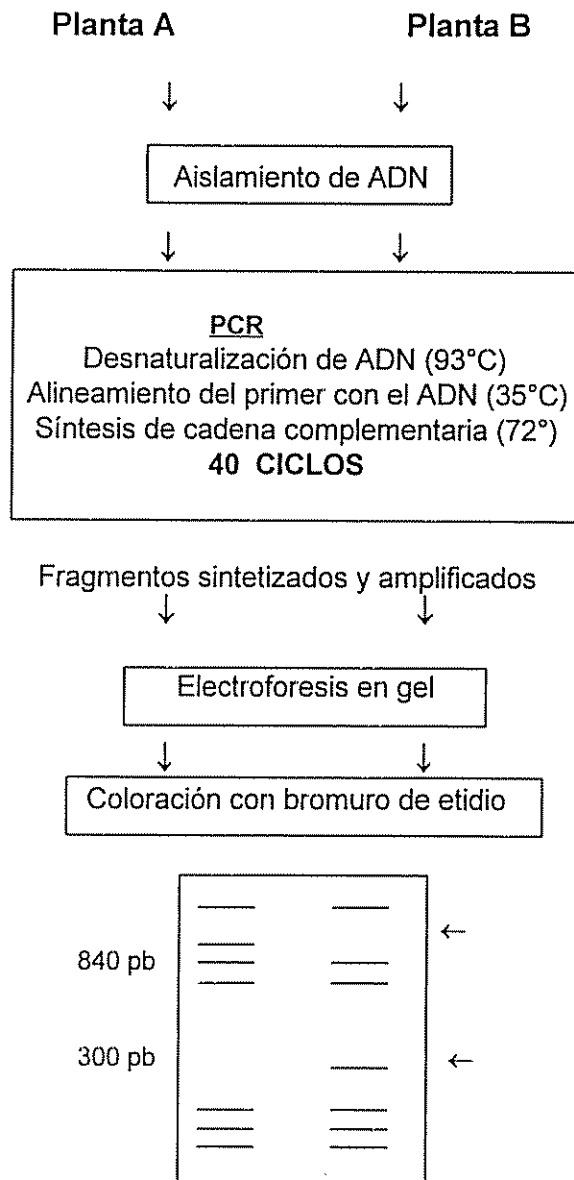


Figura 1. Generación de los RAPDs.

En este ejemplo hipotético los individuos A y B difieren entre sí por la presencia de un fragmento de aprox. 840 pb que se revela únicamente en el individuo A y por un fragmento de aprox. 300 pb que se revela en el individuo B.

### 2.4.3 Comparación entre RFLP y RAPDs

La técnica de RAPDs está basada en la amplificación del ADN, pero a diferencia de los RFLPs no se requiere el conocimiento de la secuencia. Así, este nuevo ensayo evita muchas de las limitaciones técnicas de los análisis de RFLP. Dentro de las ventajas de esta nueva técnica se incluye su simplicidad, rapidez, el requerimiento de sólo una pequeña cantidad de ADN crudo (10 ng), se puede replicar todo el genoma, usa nucleótidos al azar y el costo en que se incurre es notablemente menor que el de los RFLP (Carlson et al., 1991; Rafalski et al., 1991; Waulgh y Powell, 1992).

En comparación con otros métodos basados en marcadores moleculares, los RAPD presentan varias ventajas: (i) un grupo universal de primers pueden ser usados para el análisis genómico de una amplia variedad de especies (ii) no requiere trabajos preliminares como aislamiento de pruebas de ADN clonados o secuencias de nucleótidos (iii) no utiliza radioactividad y (iv) cada marcador de RAPD es el equivalente a una secuencia que puede marcar un lugar en un cromosoma. Una vez disponible el termociclador los costos para el inicio de ensayos con RAPDs son mínimos y el intercambio de información entre los laboratorios es simple, basta con la secuencia de primer utilizada y el tamaño de la banda polimórfica. Esto confirma la utilidad de la técnica como otro método aplicable a los programas de fitomejoramiento (Rafalski et al., 1991). Sin embargo, los RAPDs son marcadores dominantes y al no revelar loci heterocigotos no pueden ser utilizados para distinguir variantes alélicas (Waulgh y Powell, 1992). Esta naturaleza dominante debe ser tenida en cuenta para el diseño de experimentos de mapeo genético en especial cuando se trata de especies altamente relacionadas. Por esto se tienen mejores resultados cuando se usan un buen número de marcadores anónimos para definir un genoma (Williams et al., 1990).

#### 2.4.4 Uso de los RAPDs en especies cultivables

Los RAPDs han sido utilizados para estudios de evaluación de la variabilidad genética, en caracterización de recursos genéticos, para analizar relaciones filogenéticas, construir mapas genéticos y para la identificación de genes de interés. Se han hecho estudios de variabilidad en yuca (*Manihot esculenta*) (Marmey et al., 1994); aplicables en el mejoramiento de plantas y animales, así como para la caracterización de ADN en estudios de genética de poblaciones de coníferas y la estimación de tasas de cruzamiento para especies florales.

En otros géneros de plantas se ha logrado detectar niveles de diversidad entre y dentro de poblaciones de *Gliricidia sepium* y *G. maculata*, donde se encontró un 60% de variación inter-poblacional y 40% intra-poblacional. Esta clase de información es muy útil para la evaluación y conservación de los recursos genéticos forestales (Waugh y Powell, 1992). Los RAPDs se proyectan como herramientas para el manejo temprano de cultivares útiles de *Theobroma cacao* utilizando un número pequeño de primers, lo cual facilita enormemente el manejo y mantenimiento del germoplasma (Crouzillat et al, 1994).

Los RAPDs han permitido la caracterización de cultivares de interés económico. Han sido utilizados para la identificación de cultivares de brocoli y otras caulifloras. Otras similitudes entre 45 genotipos de especies cultivables se lograron establecer usando RFLPs y RAPDs (Dos Santos et al., 1994). Estudios filogenéticos en especies de palma (*Chamaecytisus proliferus* sp. Palmensis) utilizando RAPDs permitieron vislumbrar el origen de esta especie cultivada ampliamente en las Islas Canarias (Francisco-Ortega et al., 1993).



Los RAPDs han sido una técnica muy importante para la elaboración de mapas genéticos y el establecimiento de relaciones de pedigrí. Algunos estudios filogenéticos haciendo mapeo genético de cultivares de soya (*Glycine max* y *G. Soja*) y de estudios de pedigrí en líneas de maíz (*Zea mays*) (Williams et al., 1990; Welsh et al., 1991) han demostrado la utilidad para esta clase de estudios. Los experimentos con cultivares de frijol de Lima (*Phaseolus lunatus L.*) usando RAPDs han permitido medir distancias genéticas entre ellos y así organizar los bancos de germoplasma permitiendo programas de mejoramiento más eficientes (Nienhuis et al., 1995).

Finalmente esta técnica ha permitido la identificación de varios genes de interés. Trabajos con RAPDs permitieron descubrir dos variedades de tomate que diferían en un gen que le confería resistencia a *Pseudomonas*. En lechuga se lograron clasificar poblaciones que tenían los genes responsables de la resistencia al mildew (Waugh y Powell, 1992).

#### 2.4.5 Uso de los RAPDs en café

En café se han hecho estudios acerca de la diversidad genética que se encuentra dentro del género. Se ha demostrado la efectividad de esta técnica para detectar variaciones en la especie *C. arabica* y otros germoplasmas así como una posible diferenciación en el centro de origen de esta especie (Lashermes et al., 1995a). Existen trabajos preliminares acerca de la diversidad genética que existe entre variedades cultivadas y variedades silvestre de *C. arabica* utilizando RAPDs mostrando diferencias entre los dos morfotipos de esta especie (*Typica* y *Bourbon*) así como el origen geográfico del material disponible lo cual demuestra que los RAPDs reflejan diferencias morfológicas entre sub-grupos de café (Lashermes et al., 1995b).

Se han logrado establecer relaciones filogenéticas entre varias especies de café aplicando técnicas moleculares. Con los RAPDs se pudo observar una fuerte variación interespecífica que permitió distinguir por análisis de dendrogramas la mayoría de las especies de *Coffea* así como variaciones intraespecíficas dentro de los grupos formados (Cros et al., 1993). Estudios con RAPDs mostraron fácilmente variación interespecífica entre *C. arabica*, *C. canephora* y otras especies de café de Africa Occidental, central y Africa del Este. En trabajos con el Híbrido de Timor se pudo observar un producto de amplificación común a la especie *C. canephora* y varios productos comunes a *C. arabica*. Este resultado da una idea acerca del posible origen de este híbrido como resultado de un cruce inicial de las dos especies y luego de varias generaciones de retrocruces (Lashermes et al., 1993a).

Se ha iniciado la elaboración de un mapa genético utilizando la especie *C. canephora* para luego extenderla a las demás especies incluyendo a *C. arabica*. Se esperan encontrar otros marcadores polimórficos que ayuden a la elaboración del mapa y eventualmente determinar los genes de interés agronómico (Lashermes et al., 1993b). Estudios preliminares han detectado dos productos de amplificación de RAPDs que son comunes para las especies *C. arabica* y *C. canephora* analizando las variedades Rume Sudan y Catimor 5175. Esto demuestra que existen introgresiones de genes por vía natural y que los RAPDs sirven como una herramienta para detectar estos productos (Orozco-Castillo et al., 1994).

### 3. MATERIALES Y METODOS

La metodología del trabajo de tesis será explicada en cinco fases. La recolección del material vegetal, el aislamiento de ADN, la verificación de la calidad y la cantidad de ADN, la amplificación de los fragmentos de ADN u obtención de los RAPDs y el análisis de datos. La fase de recolección del material vegetal fue realizado en el germoplasma de café del CATIE y las fases siguientes en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE, Turrialba (Costa Rica).

#### 3.1 Recolección del material vegetal

Fueron recolectadas en total 67 muestras de árboles de café. Del material silvestre conservado en el germoplasma del CATIE se recolectaron 54 muestras de árboles de la recolección del ORSTOM y 14 muestras de los padres del material cultivado; representando los dos morfotipos de Arábica (*Typica* y *Bourbon*) y los padres de los cultivares americanos, Caturra, Villa Sarchí y procedencias del Híbrido de Timor (Cuadro 1). Se estudiaron individuos de las progenies 843 y 1343 derivadas del Híbrido de Timor; descendencias de individuos diferentes dentro de la misma población (1343/86, 1343/180) y dos introducciones del mismo individuo de la población 1343/933 que fueron hechas con dos años de diferencia: T.4390 introducidos en 1964 y T.4452 en 1965 ambos de Lisboa, Portugal.

Para la mayoría de las procedencias conservadas en el banco de germoplasma del CATIE existen entre uno y ocho árboles por introducción, encontrándose once introducciones con solamente uno o dos individuos por introducción. Se escogió 1 sólo árbol de cada línea por dos razones principales: dada la estructura homocigótica de la especie *C. arabica* se asumió que no

existe una gran diferencia genética entre dos individuos de la misma línea y en el caso de que ella exista, los RAPDs no son un método tan sensible como para detectar diferencias tan sutiles.

Cuadro 1. Material vegetal de *C arabica* recolectado en CATIE para el estudio

MATERIAL	IDENTIFICACIÓN CATIE	NºRECOLECCION ORSTOM	UBICACIÓN CATIE	NºARBOL
Silvestre	T 16689	ET-01	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16690	ET-02	SecciónF-4A	5
Silvestre	T 16691	ET-03	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16692	ET-04	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16693	ET-05	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16695	ET-06	SecciónF-4A	5
Silvestre	T 16696	ET-07	SecciónF-4A	3
Silvestre	T 16694	ET-08	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16697	ET-09	SecciónF-4A	4
Silvestre	T 16698	ET-10	SecciónF-4A	3
Silvestre	T 16701	ET-12	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16702	ET-13	SecciónF-4A	3
Silvestre	T 16703	ET-14	SecciónF-4A	4
Silvestre	T 16704	ET-15	SecciónF-4A	2
Silvestre	T 16705	ET-16	SecciónF-4A	1
Silvestre	T 16706	ET-17	SecciónF-4A	2
Silvestre	T 16707	ET-18	SecciónF-4A	2
Silvestre	T 16708	ET-19	SecciónF-4B	3
Silvestre	T 16709	ET-20	SecciónF-4B	6
Silvestre	T 16710	ET-21	SecciónF-4B	1
Silvestre	T 16711	ET-24	SecciónF-4B	2
Silvestre	T 16712	ET-25	SecciónF-4B	1
Silvestre	T 16713	ET-26	SecciónF-4B	1
Silvestre	T 16714	ET-27	SecciónF-4B	1
Silvestre	T 16715	ET-28	SecciónF-4B	1
Silvestre	T 16716	ET-29	SecciónF-4B	5
Silvestre	T 16717	ET-30	SecciónF-4B	3
Silvestre	T 16718	ET-31	SecciónF-4B	1
Silvestre	T 16721	ET-34	SecciónF-4B	6
Silvestre	T 16722	ET-35	SecciónF-4B	2
Silvestre	T 16723	ET-36	SecciónF-4B	2
Silvestre	T 16724	ET-40	SecciónF-4B	2
Silvestre	T 16725	ET-41	SecciónF-4B	1

Cuadro 1. (Continuación)

Silvestre	T.16726	ET-42	SecciónF-4B	5
Silvestre	T.16727	ET-43	SecciónF-4B	1
Silvestre	T.16728	ET-44	SecciónF-4B	2
Silvestre	T.16729	ET-47	SecciónF-4B	4
Silvestre	T.16730	ET-48	SecciónF-4B	2
Silvestre	T.16731	ET-49	SecciónF-4B	1
Silvestre	T.16732	ET-51	SecciónF-4B	3
Silvestre	T.16733	ET-52	SecciónF-5A	2
Silvestre	T.16734	ET-53	SecciónF-5A	2
Silvestre	T.16735	ET-54	SecciónF-5A	1
Silvestre	T.16736	ET-55	SecciónF-5A	1
Silvestre	T.16737	ET-57	SecciónF-5A	2
Silvestre	T.16738	ET-58	SecciónF-5A	1
Silvestre	T.16739	ET-59	SecciónF-5A	6
Silvestre	T.16740	ET-60	SecciónF-5A	2
Silvestre	T.16741	ET-61	SecciónF-5A	3
Silvestre	T.17218	ET-37	SecciónF-6A	1
Silvestre	T.17231	ET-45	SecciónF-6A	5
Silvestre	T.17223	ET-38	SecciónF-6B	3
Silvestre	T.17226	ET-39	SecciónF-6B	2
Silvestre	T.17232	ET-46	SecciónF-6B	1
Cultivado	<i>Bourbon rojo</i>	T.995	Sección C-4B	1
Cultivado	<i>Bourbon amarillo</i>	T.3425	Sección A-3A	1
Cultivado	<i>Typica rojo</i>	T.996	Sección C-4B	1
Cultivado	<i>Typica amarillo</i>	T.4076	Sección D-5B	1
Cultivado	<i>Caturra amarillo</i>	T.3436	Sección A-3B	1
Cultivado	<i>Bourbon rojo</i>	T.995	Sección C-4B	1
Cultivado	<i>Caturra rojo</i>	T.2308	Sección B-1	1
Cultivado	Villa Sarchí	T.17603	Sección F-6A	6
Cultivado	Villa Sarchí	T.3025	Sección D-2A	2
Cultivado	HdT 843	T.17790	Sección F-7	3
Cultivado	HdT 1343/86	T.4387	Sección D-5A	1
Cultivado	HdT 1343/180	T.4388	Sección D-5A	3
Cultivado	HdT 1343/933	T.4390	Sección D-5A	1
Cultivado	HdT 1343/258	T.4452	Sección D-5A	3

El material silvestre recolectado por el ORSTOM y conservado en la colección de CATIE ha sido sometido a 2 procesos de selección en Camerún en las que se ha homogeneizado más la estructura genética de las líneas y aumentado la homogeneidad del material que se conserva

actualmente. Las variedades cultivadas de *Bourbon*, *Typica*, Villa Sarchí y Caturra son líneas genéticamente muy homogéneas. En el caso del Híbrido de Timor, aunque son descendencias F5-F6 se intentará detectar diferencias entre individuos de la misma población y diferencias entre las líneas de descendencia.

Para la elección de un individuo que fuera representativo se hizo un muestreo dentro de cada introducción. El objetivo fue asegurar que las características observadas en este individuo fueran comunes a los demás individuos de la introducción y así disminuir la posibilidad de escoger un árbol fuera de tipo para el estudio. Para el caso de las líneas con 1 ó 2 individuos, la elección del individuo de estudio se vio limitada para las líneas con solo un árbol. En el caso de 2 individuos se eligió el más vigoroso para asegurar su supervivencia durante y después del estudio asegurando que se puedan utilizar los resultados del trabajo a corto y largo plazo.

En la etapa vegetativa de las plantas se hizo la selección del individuo representativo y luego en la época de cosecha se validó la primera selección con características de fructificación: color y forma del fruto. Se hicieron observaciones fenotípicas para ver si había similitudes con las características de los dos morfotipos de *C. arabica* (*Typica* y *Bourbon*). El *Typica* se caracteriza por tener ramas horizontales con ángulos amplios y hojas jóvenes bronceadas. El tipo *Bourbon* tiene ramas erectas y diagonales formando ángulos estrechos; y hojas jóvenes color verde claro. Se observaron otros aspectos fenotípicos como: distancia entre nudos y el vigor de la planta. La característica del vigor de la planta fue muy importante en el momento del muestreo, ya que se debía asegurar que el árbol escogido permaneciera durante el estudio y además pueda ser utilizado posteriormente.

### 3.2. Aislamiento de ADN

Se utilizó el protocolo de Francereco (Francia) sobre aislamiento de ADN de cacao y café modificado luego en el laboratorio del CATIE. El principio del método se basa en obtener ADN crudo y limpio a partir de muestras de hojas jóvenes. Para el presente estudio se utilizó la mitad de la cantidad de hojas (5 g) utilizada normalmente en el laboratorio, con el fin de reducir los costos de extracción de ADN por muestra. Como lo indican los resultados, esta cantidad permite obtener cantidades suficientes de ADN y de buena calidad. En las primeras etapas de la extracción se degradan las membranas celulares y se liberan las organelas. En las etapas siguientes se utilizan sustancias más específicas que se rompen la tensión superficial que se crea en el medio de extracción y degradan las membranas nucleares y mitocondriales, liberando el ADN de la célula (Anexo 1).

### 3.3 Verificación de la calidad de ADN

Para probar la calidad del ADN se hicieron electroforesis en gel para verificar si había o no degradación (Anexo 2). Esto fue una prueba preliminar a la de verificación de la cantidad, ya que si el ADN no estaba en buen estado se debía realizar un aislamiento nuevo.

Las causas de la degradación del ADN son debidas principalmente a la oxidación del material durante el proceso de extracción del ADN. Cuando el ADN está degradado se observa una mancha en el lugar de la muestra que se puso a migrar. Por el contrario, si está en buenas condiciones, se ve una línea de ADN en el gel con un grosor que puede ser muy tenue o denso (Figura 2).

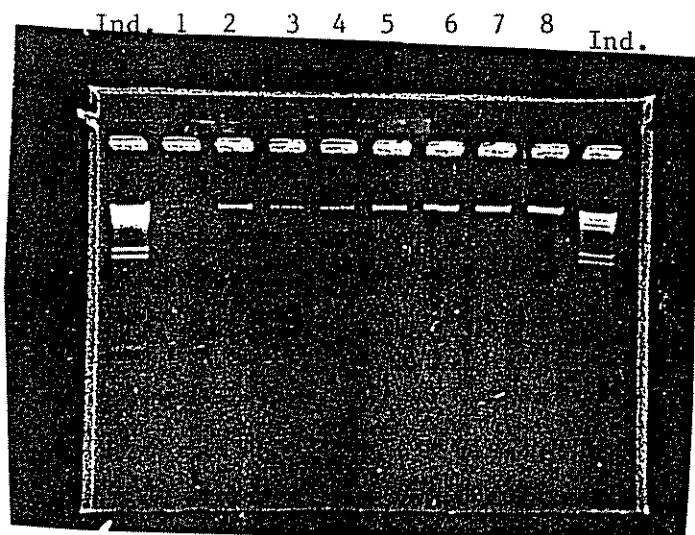


Figura 2 Verificación de la calidad de ADN con electroforesis en gel.

En este caso se observa que todas las muestras tienen ADN. Las muestras 2, 5, 6, 7 y 8 tienen una buena cantidad de ADN. Mientras que las muestras 1, 3 y 4 aparentemente tienen menos ADN. El indicador HIND III (al principio y al final) permite comparar la cantidad de ADN obtenida con cierta cantidad de pares de bases

. Muestras 1 y 2= material silvestre; muestras 3-8= material cultivado



El grosor de la banda indica la cantidad de ADN que se obtuvo. Para conocer esta cantidad se coloca dentro del gel un indicador como Hind III, el cual migra con las muestras y permite comparar la banda obtenida con el peso molecular de las distintas bandas del indicador. Esto último no se utilizó para verificar la cantidad de ADN, ya que es un método muy subjetivo y se contaba con un fluorómetro específico para esta finalidad.

### 3.4 Cuantificación del ADN

Para estimar cantidad de ADN se utilizó un mini-fluorómetro tipo TKO 100 de Hoefer Scientific Instruments cuyo diseño se basa en la cuantificación de la cantidad de ADN utilizando longitudes de ondas que son fotodetectadas. El fluorómetro detecta la cantidad de Adenina (A) y Timina (T) que se encuentra en el ADN. Las lecturas están dadas en unidades de fluorescencia que se relacionan con la cantidad de ADN en forma lineal. El proceso de calibración del fluorómetro con ADN de concentración conocida (Anexo 3) permite conocer la ecuación lineal que relaciona las lecturas con la cantidad de ADN. Luego, se procede a hacer las lecturas de las muestras de ADN y se van anotando los valores que se obtienen.

Todas las muestras fueron diluidas a partir del stock en una relación de 1/4 para facilitar la lectura. Conociendo la ecuación de la línea se puede determinar la cantidad de ADN con gran precisión a partir de la cual se hacen cálculos para determinar la cantidad de ADN que se encuentra en el stock. Este método permitió la cuantificación del ADN extraído para todas las muestras. Dado que la amplificación del ADN requiere de una cantidad muy baja (10 - 30 ng), se decidió preparar soluciones diluidas de ADN a partir de la concentración del stock haciendo cálculos para cada muestra (Anexo 4). Esto permite renovar las soluciones que se utilizan en el laboratorio para el trabajo cuando sea necesario sin contaminar el stock de ADN.

### 3.5 Amplificación del ADN (RAPDs)

La amplificación del ADN se hizo utilizando el termociclador de ADN 480 de la PERKIN ELMER con una capacidad de 48 muestras por ciclo de PCR disponible en el laboratorio. El estudio se realizó utilizando primers de la marca Operon y primers sintentizados en la UBC<sup>6</sup> previamente seleccionados con base en el polimorfismo revelado en pruebas preliminares. El volumen final de reacción fue de aprox. 25  $\mu$ l. A esta concentración se mantienen las molaridades así: 0,15 mM de cada dinucleótido (A,T,C,G) o sea 0,6 mM de la solución total de dinucleótidos, 0,4 - 0,6  $\mu$ M de primer, 0,85 U de Taq, 10 mM de Tris HCl y 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, para los dos tipos de protocolo. Algunas de las precauciones técnicas que se tomaron durante el proceso de amplificación de los RAPDs permitieron disminuir las fuentes de error y contaminación de los reactivos:

1. Se prepararon cantidades de reactivos suficiente para al menos 4 días de trabajo. De este modo, se eliminan errores en la preparación de estos reactivos, ya que al requerir cantidades tan pequeñas por muestra, se aumenta el riesgo de error preparando diariamente estos reactivos y se ahorra tiempo en cada día de trabajo.
2. Dentro de cada experimento de amplificación se incluyó una muestra "testigo". El testigo es una muestra **sin** ADN pero que contiene Master mix<sup>7</sup>, primer y taq polimerasa. Este se incluyó con el grupo de muestras tanto en el PCR como en la electroforesis y coloración del gel. El testigo permite verificar que no haya contaminación de ADN en los reactivos durante la preparación de las

---

<sup>6</sup> Universidad Columbia Britanica.

<sup>7</sup> Mezcla formada por Buffer 10X (incluye MgCl<sub>2</sub> y gelatina 0.001%), dinucleótidos y agua bidestilada en una proporción 3:3:4 respectivamente.

muestras para el PCR. De tal modo que si el testigo mostraba amplificación, el experimento era desechado; de lo contrario era considerado útil para la toma de datos.

### 3.6 Análisis de datos

La toma de datos se hizo a partir de las fotografías con los primers que mostraron polimorfismo dentro del material estudiado. La selección de las bandas polimórficas se hizo comparando el patrón de amplificación de las muestras estudiadas con patrones mostrados en otro material de café previamente estudiado (Anthony 1995, CATIE comm. pers). Las bandas (RAPDs) confiables se encuentran entre la primera y última banda de amplificación que sea constante y común para todos los individuos. Las bandas de muy bajo peso molecular no se consideran confiables ya que tienen baja repetitividad y pueden corresponder a errores de amplificación (Anthony 1995, CATIE comm. pers). Igualmente, aquellos RAPDs que mostraron polimorfismo para menos del 10% de los individuos, no se tuvieron en cuenta ya que durante el manejo estadístico de los datos estos individuos serán separados del grupo por tener baja incidencia.

Una vez determinados los RAPDs polimórficos confiables para cada primer, se hizo la codificación de la información a partir de las fotografías con los primers que mostraron polimorfismo dentro del material de estudio. La información se tradujo en tablas que comparan a todos los individuos entre sí de acuerdo con la presencia o ausencia de bandas comunes utilizando dos códigos: (0) para ausencia de la banda y (1) para presencia de una banda. El resultado final de la codificación es una matriz de datos presencia/ausencia que permite comparar a todos los individuos entre sí y hacer cálculos de distancia genética.

Los cálculos de distancias genéticas se hicieron utilizando dos índices: el Índice de Simple Apareamiento, o índice de afinidad (Simple Matching) y el índice de Jaccard. Ambos están

disponibles en programas de paquetes estadísticos en SAS y SAS para WINDOWS en el Centro de Cómputo del CATIE. Los dos métodos son utilizados para medir variables binarias, es decir aquellas conformadas por dos situaciones como en este caso de presencia/ausencia.

		Individuo B		Totales
		1	0	
Individuo A	1	a	b	a + b
	0	c	d	c + d
Totales		a + c	b + d	n

,donde  $n = a + b + c + d$ .

Para el cálculo de la distancia genética entre dos individuos, el índice de Jaccard no tiene en cuenta la condición **d** o sea, la ausencia de las variables (0-0) en los 2 individuos; mientras que en el método de Simple apareamiento los valores de 0-0 son incluidos tanto en el numerador como el denominador. Este último índice muestra una relación logarítmica con la distancia genética (Lashermes, 1993).

$$\text{Jaccard} \quad \frac{a}{a + b + c} \qquad \text{Simple Apareamiento} \quad \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

(tomado de Anderberg, 1973).

Una vez determinado el coeficiente por los dos métodos, se hizo un agrupamiento de las variables utilizando un análisis de conglomerados que fue evaluado a través de un análisis discriminante canónico para verificar la solidez de los grupos y el peso de las variables dentro de la

formación de los grupos. De esta forma se compararon los dos grupos formados a partir de los valores de distancia genética. El análisis discriminante permitió ver el aporte que dan los tratamientos (RAPDs) a la formación de los grupos y la precisión que tiene cada índice para el cálculo de la distancia genética.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Caracterización fenotípica de los individuos

De acuerdo con la metodología aplicada fue seleccionado **un** individuo de cada procedencia ya que al ser una especie autógena, no existe mucha variabilidad dentro de los individuos de una misma línea, hecho que se explica con la existencia de una base genética estrecha dentro de la especie (Berthaud y Charrier, 1988). La caracterización fenotípica realizada antes y después de la época de cosecha, permitió constatar que los individuos seleccionados en general, fueron buenos representantes de las procedencias a que pertenecen. Sin embargo, durante la validez de la selección de los individuos en la época de cosecha se encontraron individuos “fuera de tipo”; es decir que no tenían características comunes con los otros árboles de la introducción. Se trata de 2 líneas altamente heterogéneas en las que el individuo escogido puede no ser representativo. Estas introducciones fueron la introducción de café silvestre T.16740 y la introducción T.3425 que es un *Bourbon* amarillo (Cuadro 2).

La introducción T.16740 se caracteriza por tener 2 tipos de frutos: los árboles 2, 3 y 5 poseen frutos redondos y los individuos 6 y 7 tienen frutos con protuberancias que los asemejan a una pera. El individuo estudiado fue el número 2 (frutos redondos) y la elección se hizo a principio de año, lo cual no permitió la previsión de esta característica que se hace visible en época de cosecha. El individuo escogido para el estudio representa al grupo más numeroso de la línea, es decir al grupo con frutos redondos.

Cuadro 2. Caracterización fenotípica de las introducciones de CATIE estudiadas y su relación con el árbol escogido en Turrialba, Costa Rica.

MATERIAL SILVESTRE

ORSTOM	N°CATIE	Ramas	Entre-nudos	Brotes	Color fruto	Forma fruto	Conformidad
ET-01	T.16689	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-02	T.16690	Diagonales	largos	verdes	rojo	redondo	Sí
ET-03	T.16691			marrón	rojo	redondo	(?) podado
ET-04	T.16692	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-05	T.16693	Diagonales		verdes			(?) podado
ET-08	T.16694	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-06	T.16695	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-07	T.16696	Horizontales	largos	marrón		ovalado	Sí
ET-09	T.16697	Horizontales	largos	marrón	rojo	de pera	Sí
ET-10	T.16698	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-12	T.16701	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-13	T.16702	Horizontales	largos	marrón	rojo	redondo	Sí
ET-14	T.16703	Horizontales	muy largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-15	T.16704	Diagonales	largos	verdes	naranja	ovalado	Sí
ET-16	T.16705	Horizontales	cortos	marrón	rojo	ovalado	Sí
ET-17	T.16706	Horizontales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-18	T.16707	Horizontales	muy cortos	marrón	rojo	redondo	Sí
ET-19	T.16708	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-20	T.16709	Horizontales	cortos	verdes	rojo	redondo	Sí
ET-21	T.16710	Horizontales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
ET-24	T.16711	Diagonales	largos	verdes	naranja	ovalado	Sí
ET-25	T.16712	Horizontales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-26	T.16713			marrón			(?) podado
ET-27	T.16714	Diagonales	largos	marrón	naranja	en pera	Sí
ET-28	T.16715	Diagonales	cortos	verdes	rojo	redondo	(?)1 árbol
ET-29	T.16716	Diagonales	cortos	verdes			Sí
ET-30	T.16717	Diagonales	cortos	marrón	rojo	redondo	Sí
ET-31	T.16718	Diagonales	largos	marrón	rojo	redondo	Sí
ET-34	T.16721	Diagonales	largos	verdes			(?) 2 árboles
ET-35	T.16722	Horizontales	largos	verdes	rojo	ovalado	(?) 2 árboles
ET-36	T.16723	Diagonales	cortos	verdes	rojo	redondo	(?) 2 árboles
ET-40	T.16724	Horizontales	largos	marrón	rojo	redondo	Sí
ET-41	T.16725	Horizontales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
ET-42	T.16726	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí

Cuadro 2. (continuación)

ET-43	T.16727	Diagonales	cortos	verdes	rojo	redondo	(?) 2 árboles
ET-44	T.16728	Diagonales	largos	verdes	rojo	redondo	(?) 2 árboles
ET-47	T.16729	Diagonales	muy largos	verdes	rojo	redondo	Sí
ET-48	T.16730		cortos	verdes			(?) 1 árbol
ET-49	T.16731	Horizontales	muy largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
ET-51	T.16732	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-52	T.16733			verdes			(?) 1 árbol
ET-53	T.16734	Diagonales	largos	verdes			Sí
ET-54	T.16735	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-55	T.16736	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-57	T.16737	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	(?) 1 árbol
ET-58	T.16738	Diagonales	cortos	verdes			(?) 1 árbol
ET-59	T.16739	Diagonales	largos	verdes	rojo	ovalado	Sí
ET-60	T.16740	Diagonales	largos	verdes	rojo	redon. y de pera	No
ET-61	T.16741	Diagonales	largos	marrón			Sí
ET-37	T.17218	Diagonales	largos	verdes	rojo	redondo	Sí
ET-45	T.17231	Diagonales	largos	verdes			(?) 1 árbol
ET-38	T.17223	Diagonales	largos	verdes	rojo	redondo	Sí
ET-39	T.17226	Horizontales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
ET-46	T.17232	Diagonales	largos	verdes	rojo	redondo	Sí

## MATERIAL CULTIVADO

N°CATIE	Ramas	Entre-nudos	Brotes	Color fruto	Forma fruto	Conformidad
17790	Horizontales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
T.995	Diagonales	largos	marrón	rojo	redondo	Sí
T.3425	Diagonales	largos	verdes	amar-naranja	redondo	No
T.996	Diagonales	largos	marrón	rojo	redondo	Sí
T.4076	Diagonales	largos	marrón	amarillo	redondo	Sí
T.3436	Diagonales	cortos	verdes	rojo y amarillo	redondo	Sí
T.2308	Diagonales	cortos	verdes	rojo	redondo	Sí
T.17603	Diagonales	cortos	verdes	rojo	ovalado	Sí
T.3025	Horizontales	cortos	verdes	rojo	redondo	Sí
T.4387	Horizontales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
T.4388	Horizontales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
T.4390	Diagonales	largos	marrón	rojo	ovalado	Sí
T.4452	Diagonales	largos	marrón	rojo	redondo	Sí



La introducción T.3425 es del tipo Bourbon amarillo y tiene árboles con 2 colores de frutos. Los árboles 1 y 8 tienen frutos color naranja, los árboles 2, 3, 4 y 7 tienen frutos amarillos. En este último caso, el árbol estudiado fue el número 1 y por lo tanto puede ser considerado como fuera de tipo. La presencia de árboles con frutos naranjas pueden ser el resultado de alelos diferentes para esta característica o que los árboles de la introducción provienen de una línea materna que ha sufrido mutaciones cromosómicas por ser descendencias de un mismo árbol. Durante la etapa vegetativa los árboles son muy parecidos fenotípicamente y por esto fue seleccionado el árbol N°1 como representativo de la introducción. Es posible que la heterogeneidad dentro del material se deba a cambios que ha sufrido el germoplasma en Camerún (el país de donde fue introducido el germoplasma). Un posible entrecruzamiento con individuos de otras introducciones, errores dentro del material enviado al CATIE o en el momento de la siembra de la semilla; pueden explicar estos caracteres diferentes dentro de algunas introducciones.

Para algunas introducciones con 1 - 2 individuos por introducción se asumió que el árbol estudiado es representativo de su introducción dada la imposibilidad de comparación con otros árboles. Dentro de este grupo, los árboles de las introducciones T.16693, T.16730 y T.16733 se encuentran muy débiles, con mucha clorosis en sus hojas y de bajo porte. Se trata de introducciones amenazadas a desaparecer en un corto plazo dentro de la colección. En el caso de las introducciones T.16691, T.16693 y T.16713, los árboles del estudio fueron podados drásticamente durante la época de estudio por falta de comunicación entre el personal de mantenimiento y los usuarios del germoplasma. Esto impidió la verificación de la primera selección realizada en la época de fructificación.

La presencia de árboles fuera de tipo complican el muestreo de la diversidad del germoplasma utilizando características vegetativas, y aunque se hizo una validación de la primera

escogencia en la etapa de fructificación, las características observadas fueron 5 solamente. En estas características se abarca un número reducido de genes (15?) de la totalidad del genoma de la planta, el resto de las características permanece oculto ante el investigador. Los RAPDs constituyen una herramienta muy importante para detectar plantas fuera de tipo; y su eliminación permite aumentar el uso de la variabilidad que se encuentra dentro de las colecciones de germoplasma. Para el resto de las introducciones, la caracterización puede considerarse acertada y apropiada para el estudio ya que aparte de los casos mencionados anteriormente, no se encontraron otros árboles fuera de tipo. Se puede afirmar que estos resultados dan una idea de las características de las líneas o introducciones hechas por el ORSTOM en el banco de germoplasma del CATIE.

#### 4.2 Resultados del aislamiento de ADN

Se obtuvieron cantidades de ADN entre 40 y 560 ng/μl (Cuadro 3). A los datos de cantidad de ADN extraída por muestra, se les hicieron estadísticas descriptivas, con el fin de observar si el rendimiento del procedimiento de extracción de ADN se diferencia entre variedades cultivadas y silvestres. Las estadísticas descriptivas muestran los siguientes resultados para el material teniendo en cuenta su procedencia:

No. Observaciones (Muestras de ADN)	Media. (μg/ml)	Error Estándar (μg/ml)	CV=100.δ /X
Cultivado (13)	222,7	29,15	13,1%
Silvestre (54)	265,62	14,45	5,4%

El análisis de varianza para muestras diferentes indica que el rendimiento de ADN obtenido por muestra no depende del origen del material ( $F' = 1,06$ ). Las cantidades obtenidas de ADN

varían de una muestra a otra, lo cual indica que el rendimiento del proceso depende de aspectos técnicos como la maceración y posiblemente de aspectos intrínsecos a la naturaleza biológica de algunas muestras.

Cuadro 3. Rendimiento de la extracción de ADN para los individuos de *C. arabica* del estudio en CATIE, Turrialba, Costa Rica.

MATERIAL SILVESTRE

No. CATIE	Cantidad de ADN ( $\mu\text{g}$ de ADN/ ml)	No CATIE	Cantidad de ADN ( $\mu\text{g}$ de ADN/ ml)
T.16689	216	T.16718	290
T.16690	174	T.16721	300
T.16691	77	T.16722	320
T.16692	107	T.16723	350
T.16693	330	T.17218	280
T.16695	200	T.17723	220
T.16696	300	T.17726	350
T.16694	200	T.16724	280
T.16697	400	T.16725	230
T.16698	400	T.16726	174
T.16701	300	T.16727	308
T.16702	370	T.16728	260
T.16703	213	T.17231	290
T.16704	216	T.17232	440
T.16705	200	T.16729	340
T.16706	230	T.16730	480
T.16707	94	T.16731	360
T.16708	128	T.16732	100
T.16709	360	T.16733	78
T.16710	278	T.16734	110
T.16711	560	T.16735	240
T.16712	210	T.16736	240
T.16713	300	T.16737	240
T.16714	240	T.16738	450
T.16715	300	T.16739	324
T.16716	234	T.16740	480
T.16717	140	T.16741	234

Cuadro 3. (Continuación)

## MATERIAL CULTIVADO

Introducción	Identificación	Cantidad de ADN ( $\mu\text{g}$ de ADN / ml)
T. 3025	Villa Sarchí	260
T. 17603	Villa Sarchí	180
T. 3436	Caturra amarillo	120
T. 2308	Caturra rojo	350
T. 4076	Typica amarillo	330
T. 996	Typica rojo	360
T. 3425	Bourbon amarillo	230
T. 995	Bourbon rojo	220
T. 17790	Híbrido de Timor	50
T. 4387	Híbrido de Timor	330
T. 4388	Híbrido de Timor	65
T. 4390	Híbrido de Timor	140
T. 4452	Híbrido de Timor	240

La intensidad en la maceración de las hojas influye poderosamente en la cantidad de ADN que se puede extraer por muestra colectada. Una pulverización total de la muestra con el nitrógeno líquido permite que las sustancias extractoras actúen sobre una mayor superficie de acción y por lo tanto la cantidad de ADN extraída aumenta considerablemente como ha sido demostrado en el laboratorio. Las muestras con menor cantidad de ADN corresponden a los primeros aislamientos en los que no se dominaba la técnica totalmente y la maceración no era lo suficientemente fuerte para permitir la obtención de una mayor cantidad de ADN. Sin embargo, las cantidades extraídas aunque fueron bajas permitieron la obtención de los RAPDs. Asimismo, no se observó oxidación en las muestras lo cual indica que se mantuvieron las condiciones del aislamiento adecuadas y una buena conservación del ADN.

Las cantidades de ADN que se obtienen dependen mucho de los individuos a estudiar. Esto debe estar relacionado con la naturaleza del material que se trabaja, ya que se ha comprobado que para algunas introducciones la cantidad extraída de ADN no aumenta al repetir el procedimiento de un día a otro (Quirós 1995, CATIE comm. pers). Aunque la naturaleza del material no fue un factor tan determinante durante el aislamiento de las muestras del estudio pudo influir en aquellos casos donde se extrajo una cantidad de ADN baja. Finalmente se comprobó que el protocolo de extracción utilizado en el laboratorio para café permite la obtención de ADN con una buena calidad lo cual permite la obtención de los RAPDs. Este proceso de aislamiento es muy rápido y relativamente barato, además no se utilizan sustancias cancerígenas ni mutagénicas. Con los árboles bajo estudio no se repitieron aislamientos y las cantidades obtenidas permitieron diluciones con suficiente cantidad para el trabajo con los RAPDs.

#### 4.3 Protocolo usado para la amplificación de los RAPDs

Las molaridades de los reactivos utilizadas fueron respetadas de acuerdo con la metodología de los RAPDs y permitieron en buenas condiciones la visualización de las bandas polimórficas (Cuadro 4). Durante las primeras etapas del trabajo con los RAPDs hubo amplificación del testigo, lo cual indicó que existía contaminación de ADN en los reactivos de trabajo. Se pudo comprobar que ésta ocurría durante la preparación del PCR y no después del PCR, es decir en el momento de la electroforesis. Esto pudo ocurrir al momento de destapar los tubos de ADN ya que salpicaba los tubos de PCR que iban luego a ser introducidos en el termociclador para ser amplificados.

El problema se superó destapando las muestras aproximadamente 15 centímetros lejos de los tubos de PCR para eliminar la contaminación. Después de esta medida no hubo amplificación del testigo lo cual aseguró resultados más confiables y se comprobó que se obtienen buenos

resultados con precauciones sencillas en el momento de la manipulación de los reactivos de PCR. La literatura recomienda separar las etapas pre-PCR localmente de la etapa pos-PCR, incluyendo la utilización de pipetas exclusivamente para cada proceso lo cual minimiza aún más los riesgos de contaminación (Kwok y Higuchi, 1989; Dragon, 1993).

**Cuadro 4.** Concentraciones y cantidad de reactivos para la amplificación de los RAPDs en CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Reactivos	[ ] Stock	[ ] Intermedia	[ ] Trabajo	Volumen final (25 µl)
ADN	variable	50-100 ng/µl	7 ng/µl	5µl
Taq	5 U	-	0,17 U/µl	5µl
primer	1 mM	25 µM	0,4 - 2µM	5µl
*Tris - HCl	100 mM	-	10 mM	2,5 µl
*MgCl <sub>2</sub>	25 mM	-	3,5 mM	
*KCl	100 mM	-	10 mM	
Sol. Dinucleótidos	10 mM	-	0,45 mM *	3 µl
Agua bidest.	-	-	-	4,5µl

\* Estos reactivos vienen incluidos en el Buffer 10X para PCR o pueden prepararse por aparte. En tal caso se conserva la cantidad de Buffer (2,5 µl) y se añaden 3,5 µl de la solución de MgCl<sub>2</sub> que venden cuya concentración es de 25 mM. Los 10 µl se ajustan disminuyendo la cantidad de agua

En el laboratorio del CATIE las pipetas no pudieron ser usadas con exclusividad en el trabajo por cuestiones de presupuesto por lo que se trató de separar al máximo los instrumentos de trabajo para cada las 2 etapas del PCR. Los volúmenes de reactivos se hicieron para un máximo de 4-5 días de acuerdo con la cantidad de nucleótidos disponibles para el trabajo.

#### 4.4 Análisis del polimorfismo del material silvestre

En el caso del material silvestre se utilizaron los primers de Francia que fueron previamente seleccionados por mostrar polimorfismo en café en pruebas realizadas por el proyecto café del CATIE. Los primers utilizados fueron: el M-4, X-9, N-20, I-7, L-18, X-20 y X-16. Con los cuatro primeros se consiguió buenas amplificaciones y se encontró polimorfismo dentro del material. De ellos se tenía una cantidad suficiente para el análisis de todas las muestras y para las repeticiones que fueran necesarias. Sin embargo, los patrones de amplificación de algunos primers con las introducciones del ORSTOM fueron diferentes a los patrones vistos en otras muestras de café en estudios anteriores (Anthony 1995, CATIE comm. pers.).

Con los datos obtenidos de los primers se realizó el análisis estadístico según la presencia o ausencia de bandas dentro del material. Con los primers L-18, X-20 y X-16 no se obtuvieron resultados confiables ya que amplificaron débilmente y por lo tanto no fueron utilizados para identificar el material. Debido a la alta homogeneidad que se encontró en el material silvestre se decidió hacer repeticiones de aquellas muestras que presentaran bandas diferentes (RAPDs polimórficos) dentro del material con dos objetivos: para verificar si se trataba de RAPDs confiables o sea, si se mantiene el polimorfismo y/o para desechar que se tratara de un error de manipulación o de la máquina.

Se observó que el primer N-20 tiene un RAPD polimórfico de aprox. 984 pb (Figura 3) y su patrón de amplificación es muy parecido al mostrado en trabajos anteriores. Los demás primers también presentaron diferencias importantes para la toma de datos. El primer M-4 tiene 3 RAPDs polimórficos que corresponden a 492 pb, 730 pb y 960 pb aprox. Sin embargo, este primer no

mostró los 2 primeros RAPDs polimórficos de una forma intensiva, por lo cual se excluyeron del análisis. Solo se usó el RAPD M4-960 pb para la toma de datos y el análisis estadístico.

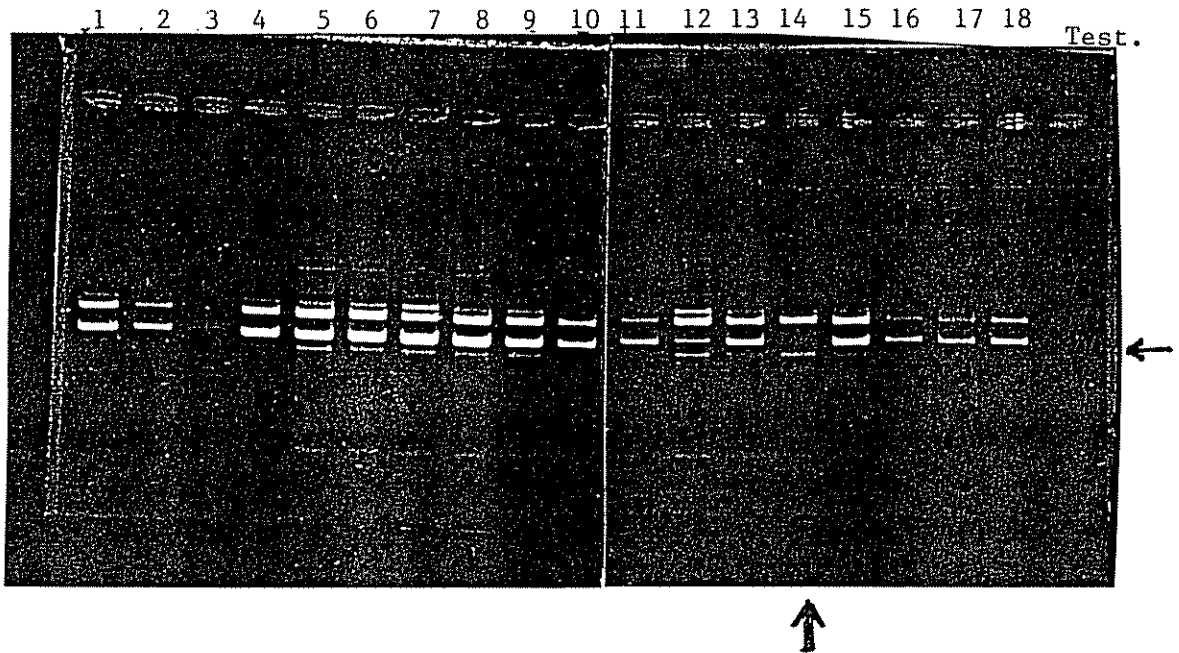


Figura 3. Amplificación de 17 muestras de material silvestre con el primer N-20. CATIE, 1995.

El RAPD polimórfico es de aprox 984 pb. Sólo la muestra 14 = ET-61 carece de este RAPD. Las otras muestras amplifican igual con este primer. La muestra 3 falló en la amplificación.



En el primer X-9 se observaron 2 RAPDs polimórficos, uno de 492 pb aprox. que no se vio suficientemente bien en las muestras y por lo tanto su presencia o ausencia no se pudo determinar con seguridad y se excluyó del análisis de datos. El segundo RAPD de 984 pb que mostró este primer sí se incluyó dentro del análisis ya que de se obtuvieron buenas fotografías y repitió fielmente su polimorfismo (Figura 4). El primer I-7 se caracteriza por mostrar 2 RAPDs polimórficos para café: uno de 1600 pb y otro de 700 pb aprox. Con el material silvestre no se observó el primer RAPD de 1600 pb. Se observó el segundo RAPD de 700 pb y uno nuevo de aprox. 360 pb, que se repitió en las comprobaciones posteriores y por lo tanto se incluyeron ambas bandas en el análisis de datos.

Los análisis de datos revelan una alta uniformidad dentro del material estudiado, tal como se puede ver en las fotografías tomadas durante el estudio, con valores de T que indican como la pertenencia de algunos individuos a un grupo o a otro es prácticamente la misma. A pesar de estos valores de T, los análisis de conglomerados utilizando el índice de Jaccard detectan 2 grupos bien formados de acuerdo con la presencia y/o ausencia de los RAPDs polimórficos para uno u otro grupo. Con el coeficiente de Jaccard se observan 2 grupos bien definidos mientras que el índice de Simple Apareamiento revela 3 grupos.

El primer grupo de individuos es igual para ambos casos (índice de Jaccard y Simple apareamiento), pero el análisis de simple apareamiento toma en cuenta las diferencias de ausencia del RAPD I-7 700 pb; lo cual no es diferenciado con el índice de Jaccard. El tercer grupo de individuos corresponde a una subdivisión exacta del primer grupo formado por Jaccard y cuya diferencia se basa en la ausencia del RAPD polimórfico de 700 pb revelado con el primer I-7, de acuerdo con la salida del programa que demuestra la contribución de los RAPDs en la formación de los grupos (Figura 5).

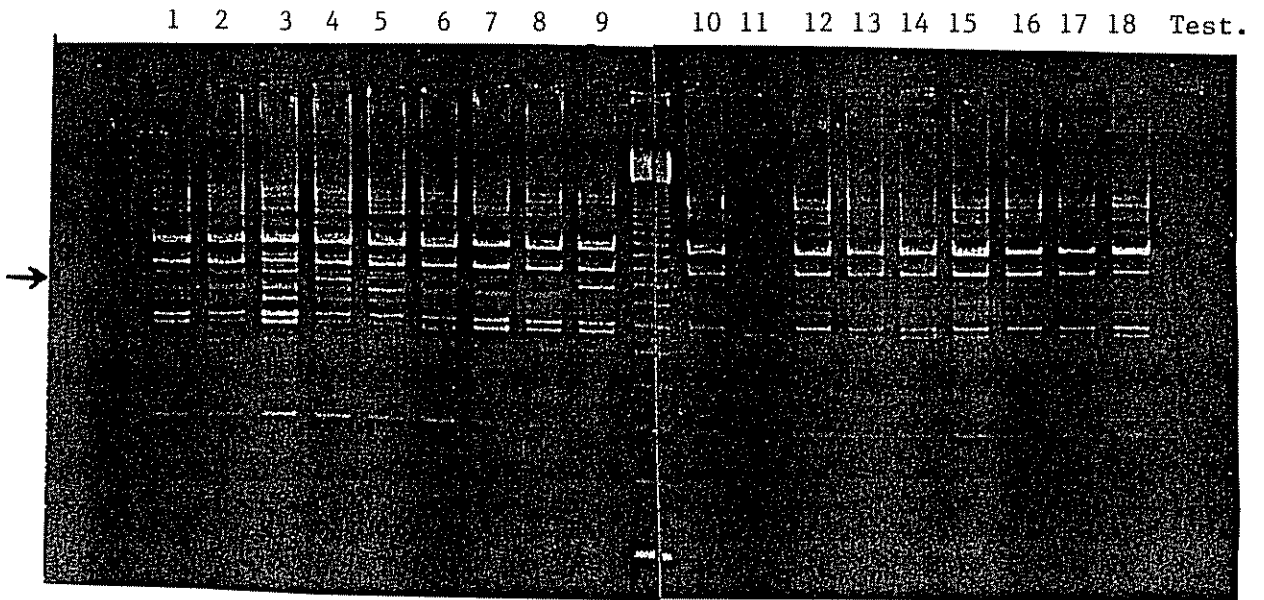


Figura 4. Patrón de amplificación mostrado con el primer X-9 dentro del material silvestre.

Sólo las muestras 4= ET-34 y 9= ET-39 presentan un RAPD de 984 pb aprox. Las otras muestras presentan bandas similares y no se revela polimorfismo. La muestra 11= ET-44 no amplificó por tener muy poco ADN.

Coeficiente Jaccard

Coeficiente de Simple  
Apareamiento

Grupo 1	ET-13	ET-14	ET-17	Grupo 1
	ET-18	ET-19	ET-24	
	ET-28	ET-29	ET-30	
	ET-31	ET-35	ET-36	
	ET-49			
Grupo 2	ET-01	ET-03	ET-04	Grupo 2
	ET-05	ET-07	ET-16	
	ET-20	ET-21	ET-25	
	ET-26	ET-27	ET-37	
	ET-38	ET-41	ET-61	
Grupo 2	ET-02	ET-06	ET-08	Grupo 3
	ET-09	ET-10	ET-12	
	ET-15	ET-34	ET-39	
	ET-40	ET-42	ET-43	
	ET-44	ET-45	ET-46	
	ET-47	ET-48	ET-51	
	ET-52	ET-53	ET-54	
	ET-55	ET-57	ET-58	
ET-59	ET-60			

Figura 5. Grupos genéticos de café silvestre según los análisis de distancias genéticas. CATIE, 1995

El fundamento matemático del método de Simple Apareamiento con relación a la distancia genética, puede influir en la detección de diferencias pequeñas dentro de grupos altamente homogéneos. Esto mismo explica el hecho que el índice de Jaccard no permita hacer la diferenciación de un tercer grupo en este caso. Se relacionó la estructura de los grupos con la procedencia del material, específicamente con la altura de la que provienen los individuos colectados, pero no existe una correlación exacta entre ellos. Solamente el grupo 3 formado por el Simple Apareamiento contiene a los individuos de altitudes mayores (1600-1800 msnm), pero la misma razón no explica la agrupación en los otros 2 conjuntos de individuos.

Estos resultados sugieren que el número de RAPDs para el cálculo de distancias genéticas influye poderosamente para una diferenciación dentro de grupos altamente homogéneos, ya que algunos coeficientes para el cálculo de distancia genética no son tan sensibles a diferencias muy pequeñas entre individuos. El número de marcadores moleculares polimórficos usado para determinar relaciones genéticas es muy variado. Al utilizar muchos marcadores se aumenta por un lado el cubrimiento de la mayoría del genoma y se minimiza al mismo tiempo los errores de un submuestreo de ciertas regiones del genoma (Nienhuis et al., 1992).

En este estudio, se utilizaron 5 RAPDs polimórficos para hacer las inferencias genéticas y de acuerdo con los planteamientos anteriores. Este número tan reducido de RAPDs polimórficos hace que el coeficiente de variación que afecta los datos varíe entre un 90-95%. Estudios en poblaciones de frijol altamente relacionadas han demostrado que dado que son pocas las bandas polimórficas que existen para comparar individuos altamente relacionados en comparación con las que se utilizan con individuos más distantes (Nienhuis et al., 1994). Si se trata de individuos muy relacionados, hay menos bandas polimórficas que puedan diferenciarlos.

De ahí, que exista la necesidad de revelar más RAPDs en poblaciones homogéneas que si se tratara de individuos más distantes.

Estudios previos han demostrado el bajo polimorfismo que se detecta dentro de la especie *C. arabica* tanto en análisis enzimáticos (Berthou y Trouslot, 1977) como en análisis con RAPDs polimórficos otras especies de *Coffea* (Lashermes et al., 1993a). Sin embargo, en estudios recientes se logró demostrar que existe una importante diversidad genética dentro del germoplasma de *C. arabica* y que se pueden detectar diferencias entre los dos morfotipos *Typica* y *Bourbon* (Lashermes et al., 1995a). Por lo tanto la tesis de utilizar un mayor número de primers para completar este estudio para una especie tan altamente homogénea como es *C. arabica* tal vez, contribuiría favorablemente a la clasificación previa que se hizo con este material.

#### 4.5 Caracterización molecular del material cultivado

Con el material cultivado se utilizaron los mismos primers de la marca Operon que mostraron polimorfismo dentro del material silvestre. Además, se hizo una búsqueda de nuevos primers polimórficos en café sintetizados por la UBC utilizando 4 muestras escogidas del total de las 14 procedencias de material cultivado teniendo en cuenta que fueran diferentes entre si (ver Cuadro 1). La selección se hizo con: dos híbridos de Timor (T.17790 y T.4387), un *Typica* (T.4076) y un *Bourbon* (T.995), que resultaron ser útiles para encontrar primers que muestran polimorfismo dentro del material cultivado. Se ensayaron un total de 26 primers, 22 de la UBC más los 4 de Francia.

Para diluir estos primers se hicieron los cálculos individualmente utilizando el peso molecular para llegar a una dilución inicial de 0,4  $\mu$ M en el volumen final de reacción de cada tubo

de PCR. Esta precaución se tuvo para hacer diluciones más exactas y asegurar que la concentración final fuera la correcta ya que el peso entregado por la firma productora no se verifica.

En las pruebas preliminares con los primers de la UBC se ensayaron 2 tipos de diluciones: la primera con una concentración final de primer de 0,4  $\mu\text{M}$  que no permitió una buena visualización de las bandas y una segunda dilución con una concentración final de 0,52  $\mu\text{M}$ . Esta última dilución llamada dilución 2 resultó adecuada para el trabajo ya que permitió buenas amplificaciones. En algunos casos, se utilizó una tercera dilución concentrando más el primer a 0.6  $\mu\text{M}$  ya que con una concentración menor no se obtuvo una buena amplificación.

De los 26 primers de la UBC probados con este material solamente 4 primers revelaron polimorfismo, estos fueron: UBC 203, 204, 250 y 253 (Cuadro 5). Con los primers de Francia no se reveló polimorfismo dentro del material y 6 primers amplificaron débilmente lo cual no permitió determinar si son útiles para caracterizar este material. Estos últimos se repitieron pero no hubo revelación de buenas amplificaciones. Esto puede estar relacionado con la calidad del primer, ya que se aumentó la concentración de primer pero no se mejoró la amplificación. El primer UBC-203 mostró un RAPD polimórfico para este material de aprox. 860 pb presente en los individuos 843 y 1343/933 del Híbrido de Timor únicamente. Para los demás individuos del material cultivado no se observaron diferencias en la amplificación de este primer (Figura 6).

El primer UBC-253 tiene un RAPD polimórfico de 370 pb aprox. para los individuos 1343/933 y 1343/86 del Híbrido de Timor. El resto del material parece ser uniforme para este primer (Figura 7). El primer UBC-250 parece ser polimórfico para este material, sin embargo el RAPD que parece mostrar diferencias es de muy bajo peso molecular y no se repite fielmente aún cuando se concentró más el primer. Es decir que no es un RAPD fuerte y por lo tanto no sirve para

caracterizar este material. Con los primers UBC 204, 205, 214, 215, 218 y 219 no se obtuvieron buenas amplificaciones por lo tanto, no se sabe si sirven para caracterizar a este material.

Cuadro 5. Primers probados con el material cultivado de *C. arabica* en CATIE, Turrialba, Costa Rica.

PRIMER	Secuencia de nucleótidos	Conc.[ ] $\mu$ M	Amplificó	Polimórfico
M-4	GGC GGT TGT C	0.4	Sí	No
X-9	GGT CTG GTT G	0.4	Sí	No
I-7	CAG CGA CAA G	0.4	Sí	No
N-20	GGT GCT CCG T	0.4	Sí	No
UBC-201	CTG GGG ATT T	0.52	Sí	No
UBC-203	GAG CAC TTA C	0.52	Sí	Sí
UBC-204	TTC GGG CCG T	0,52 - 0,6	Sí	?
UBC-205	CGG TTT GGA A	0,52 - 0,6	Débil	?
UBC-209	TGC ACT GGA G	0.52	Si	No
UBC-210	GCA CCG AGA G	0.52	Si	No
UBC-211	GAA GCG AGA G	0.52	Si	No
UBC-213	CAG CGA ACT A	0.52	Si	No
UBC-214	CAT GTG CTT G	0.52	No	?
UBC-215	TCA CAC GTG C	0.52	No	?
UBC-218	CTC AGC CCA G	0.52	No	?
UBC-219	GTG ACC TCA G	0.52	Débil	?
UBC-227	CTA GAG GTC C	0.52	Si	No
UBC-229	CCA CCC AGA G	0.52	Sí	No
UBC-233	CTA TGC GCG C	0.52	Sí	No
UBC-234	TCC ACG GAC G	0.52	Sí	No
UBC-238	CTG TCC AGC A	0.52	Sí	No
UBC-239	CTG AAG CGG A	0.52	Sí	No
UBC-240	ATG TTC CAG G	0.52	Sí	No
UBC-241	GCC CGA CGC G	0.52	Sí	No
UBC-250	CGA CAG TCC C	0.6	Sí	?
UBC-253	CCG TGC AGT A	0.52	Sí	Sí

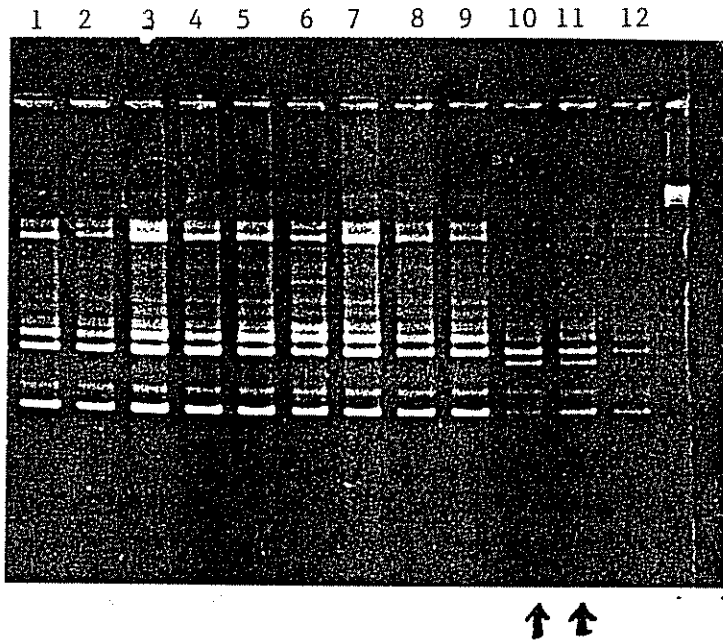


Figura 6. Polimorfismo dentro del material cultivado mostrado por el primer UBC-203.

Se observa un patrón de bandas común para todo el material excepto para los individuos 10=843 y 11= 1343/933 (Híbridos de Timor). Ellos tienen un RAPD más de aprox 860 pb.



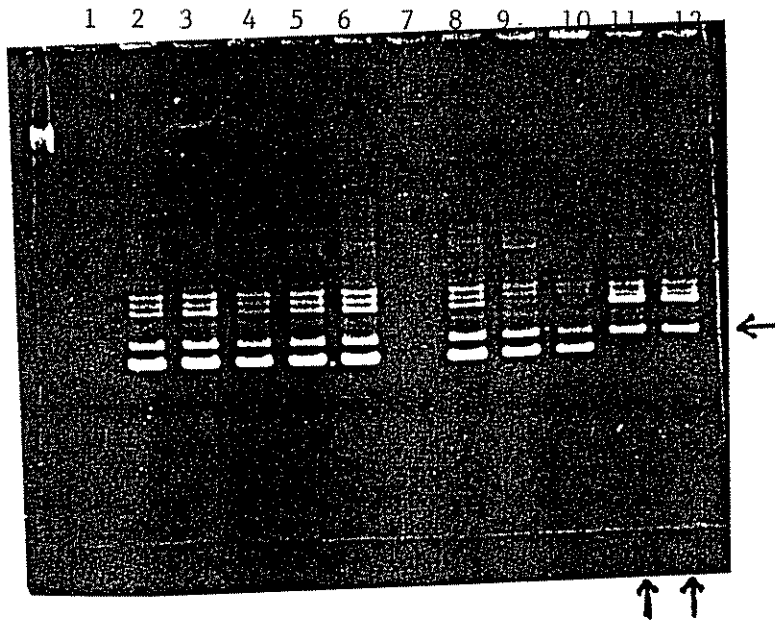


Figura 7. Polimorfismo dentro del material cultivado revelado por el primer UBC-253.

Para los individuos 11= 1343/933 y 12= 1343/86 este primer no amplifica un RAPD de aprox. 370 pb que está presente en los demás individuos de la serie. Los otros RAPDs tienen un patrón de amplificación similar para las otras muestras. Se ven 2 muestras que no amplificaron.

Este material por lo tanto, aunque se esperaba que mostrara mayor polimorfismo que el material silvestre dado que está más expuesto a cambios por ser un material cultivado y utilizado como fuente de variación genética, se muestra casi tan uniforme como el material silvestre. Se esperaba encontrar mayor polimorfismo dentro de los Híbridos de Timor por tratarse de individuos más heterogéneos. En estudios anteriores se ha demostrado una muy posible derivación genética de este Híbrido a partir de *C. arabica* y *C. canephora* (Goncalves y Rodríguez, 1976). Estudios de polimorfismo dentro del género *Coffea* revelaron 3 productos diferentes entre el Híbrido y las colecciones de *C. arabica*. Esto hace pensar que los trabajos de domesticación y las progenies derivadas de esta especie pueden haber disminuido la heterocigocidad de este material y que tal vez ha ocurrido una pérdida de fragmentos de ADN provenientes de *C. canephora*.

De hecho el material de café que se conserva en la colección del CATIE no corresponde a individuos provenientes de generaciones F1 ni F2, sino de generaciones hasta F4, F5 y hasta F6 de los progenitores de los que se derivan. A este nivel la autogamia puede haber producido cierto grado de homocigocidad dentro del material. Sin embargo, sería recomendable continuar con la búsqueda de primers polimórficos para este material ya que sólo se muestreó un número relativamente bajo de primers por falta de tiempo. Además las pruebas preliminares con varios primers aparentemente revelan polimorfismo dentro de este material lo cual sugiere que las fallas en las amplificaciones pueden deberse en parte a la calidad de los primers.

## 5. CONCLUSIONES

La conservación de recursos genéticos de varias especies de interés se hace necesaria día a día. Pero más aún es la caracterización genética del material conservado lo que están requiriendo actualmente los programas de mejoramiento. Una caracterización netamente fenotípica es necesaria, pero no abarca todo el genoma de la planta y por lo tanto permite la inclusión de plantas fuera de tipo que resultan un obstáculo para la utilización de la diversidad de un germoplasma.

Los RAPDs son marcadores moleculares que revelan variaciones en la secuencia de ADN por la amplificación diferencial de varios fragmentos, de tal forma que la diversidad genética dentro de especies muy homogéneas puede ser medido utilizando este método. La metodología de RAPDs requiere de mucho cuidado en su manipulación ya que los RAPDs son un método confiable para la caracterización de *C. arabica*; pero es bajo condiciones uniformes cuando se consiguen repeticiones fiables de un laboratorio a otro.

El material silvestre recolectado por el ORSTOM y conservado en el germoplasma del CATIE, se muestra aparentemente muy homogéneo genéticamente. Esto puede deberse a que el material introducido en CATIE proviene de Camerún donde ha sufrido dos procesos de homogenización reduciendo entonces la variabilidad conservada. Los grupos formados por el análisis estadístico deben ser revalidados utilizando un número mayor de RAPDs polimórficos para este material.

La búsqueda de primers polimórficos para caracterizar sub-grupos de *C. arabica* parece ser difícil dentro del material silvestre como dentro de material cultivado, contrario a lo que se esperaba

al inicio del trabajo. El material cultivado presenta un comportamiento muy homogéneo ante los primers ensayados lo cual respalda la teoría de una base genética estrecha de la cual provienen.

La especie *C. arabica* se caracteriza por ser una especie altamente homogénea y es por esto que el número de RAPDs polimórficos es menor que en especies heterogéneas lo cual dificulta la identificación o caracterización de grupos dentro del material estudiado. Este trabajo constituye una base preliminar para conocer la estructura genética de parte del germoplasma del CATIE; por lo que se debe continuar la búsqueda de primers y RAPDs polimórficos que permitan identificar el material silvestre y encontrar primers que identifiquen los morfotipos de *C. arabica*, los Híbridos y los distintos cultivares derivados de los cruces entre ellos.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar G., Bertrand B., Anthony F., 1995. *Comportamiento agronómico y resistencia a las principales plagas de diferentes variedades, derivadas del Híbrido de Timor*. XVII Simposio sobre Caficultura Latinoamericana, San Salvador (El Salvador) en proceso de impresión.
- Andersen M., 1973. *Cluster analysis for applications* Academic Press, N.Y-San Francisco-Londres. 359 p.
- Anthony F., Bertrand B., Dufour M., Escalant J.V., 1993a. *Evaluación y caracterización de los recursos genéticos de café conservados en el germoplasma del CATIE*. XVI. Simposio de caficultura latinoamericana. Managua (Nicaragua) (en proceso de impresión).
- Anthony F., Clifford M., Noirot M., 1993b. *Biochemical diversity in the genus Coffea L.: chlorogenic acids, caffeine and Mozambioside contents*. Genetic Resources and Crop Evolution 40:61-70.
- Anzueto F., 1993. *Etude de la résistance du caféier (Coffea sp.) à Meloidogyne sp. et Pratylenchus sp.* Tesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (Francia), 123p.
- Berthaud J., Charrier A., 1988. *Genetic Resources of Coffea*. In: Clarke, R. : Macrae, R. (eds.). 1988. *Coffee. Volume 4. Agronomy*. Londres (Inglaterra). 1-42.

- Berthou F., Trouslot P., 1977. *L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre Coffea: Adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série, premiers résultats*. ASIC 8<sup>avo</sup> Coloquio, Abidjan: 373-383.
- Carlson J., Tulsieram J., Glaubitz J., Luk V.W.K., Kaufelt C., Rutledge R., 1991. *Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers*. Theor. Appl. Genet.83: 194-200.
- Carvalho A., 1988. *Principles and Practice of Coffee Plant Breeding for Productivity and Quality Factors: Coffea arabica*. In: Clarke, R.; Macrae, R. (eds.). 1988. *Coffee Volume 4: Agronomy*. Londres (Inglaterra). 129-160.
- Cros J., Lashermes Ph., Marmey Ph., Anthony F., Hamon S., Charrier A., 1993. *Molecular Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in Coffea*. ASIC, 15<sup>avo</sup> Coloquio, Montpellier (Francia): 41-46.
- Charrier A., 1978. *Résultats des études et des expérimentations réalisées au Cameroun, en Côte d'Ivoire et à Madagascar sur l'espèce Coffea arabica L. collectée en Ethiopie par une mission ORSTOM en 1966*. Boletín N°14. IFCC. Paris (Francia) 100 p.
- Crouzillat D., Lerceteau E., Pétiard V., Morera J., Rodríguez H., Walker D., Phillips W., Schnell R., Ronning C., Osei J., Fritz P., 1994. *Proceedings of the International Workshop on cocoa breeding*. INGENIC, Kualalumpur (Malaysia) Octobre 18-19.

- Dos Santos J., Nienhuis J., Skroch P., Tivang J., Slocum M., 1994. *Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among Brassica oleracea L. genotypes*. Theor Appl Genet 87:909-915.
- Dragon E., 1993. *Handling reagents in the PCR laboratory*. Suplemento de Cold Spring Harbor Laboratory, PCR Methods and Applications 3: 58-59.
- FAO., 1968. FAO Coffee mision to Ethiopia 1964-1965. Informe FAO, Roma (Italia), 200 p.
- Francisco-Ortega J., Newbury H., Ford-Lloyd B., 1993. *Numerical analyses of RAPD data highlight the origin of cultivated tagasaste (Chamaecytisus proliferus spp. palmensis) in the Canary Islands*. Theor Appl Genet 87:264-270.
- Goncalves M.M., Rodrigues M.L., 1976. *Estudos sobre o café de Timor. II Nota sobre as possibilidades de producao do Hibrido de Timor no seu habitat natural*. Lisboa (Portugal)Comunicacoes 86:31-72.
- Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T., 1990. *PCR protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, USA; 482 p.
- Kwok S., Higuchi R., 1989. *Avoiding false positives with PCR* Nature 339:237-238.
- Lashermes P., Cros J., Marmey Ph., Charrier A., 1993a. *Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of Coffea species*. Genetic Resources and Crop Evolution 40:91-99.

- \_\_\_\_\_, Paillard M., Marmey P., Gavalda M., Couturon E., Pétiard V., Charrier A., 1993b. *Toward the construction of a genetic map in coffee*. ASIC, 15avo Coloquio, Montpellier, 1993:773-774.
- \_\_\_\_\_, Combes M.C., Cros J., Trouslot P., Anthony F., Charrier A., 1995a. *Origin and genetic diversity of Coffea arabica L. based on DNA molecular markers*. ASIC, 16avo Coloquio, Kyoto (Japón), 1995. (en proceso de impresión).
- Lashermeres P., Trouslot P., Anthony F., Combes M.C., Cros J., Charrier A., 1995b. *Evaluation of genetic diversity between cultivated and wild accessions of Coffea arabica through random amplified polymorphic DNA analysis*. Euphytica, aceptado.
- Leguizamón C.J., 1983. *Contribución a la connaissance de la résistance incomplète du caféier Arabica (Coffea Arabica L.) à la rouille orangée (Hemileia vastratrix Berk et Br.)*. Tesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (Francia), 183 p.
- Louarn J., 1978. *Diversité comparée des descendances de Coffea arabica obtenues en autofécondation en fécondation libre au Tonkoui*. Boletín 14, IFCC, Paris (Francia): 75-78.
- Marmey P., Beeching J., Hamon S., Charrier A., 1994. *Evaluation of cassava (Manihot esculenta Crantz) germplasm collections using RAPD markers*. Euphytica 74: 203-209.
- Morera J., Umaña C., Mora E., Hidalgo G., 1993. *Banco de Germoplasma de café del CATIE*. Informe del CATIE, Turrialba (Costa Rica), 132 p.



- Nienhuis J., Tivang J., Skroch P., 1992. *Analysis of Genetic Relationships using RAPD marker data*. Joint Plant Breeding Symposia Series. Noviembre, 1992. Minneapolis, USA.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, 1994. *Analysis of Genetic Relationships among Genotypes Based on Molecular Marker Data*. Joint Plant Breeding Symposia Series. Agosto 5-6, Corvallis, USA.
- Nienhuis J., Tivang J., Skroch P., Dos Santos J., 1995. *Genetic relationships among cultivars and landraces of Lima Bean (Phaseolus lunatus L.) as measured by RAPD markers*. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 120(2):300-306.
- Orozco-Castillo C., Chalmers K., Waugh R., Powell W., 1994. *Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers*. Theor Appl Genet 87:934-940.
- Osorto J., 1991. *El programa de selección y evaluación de variedades de café en América Central*. ASIC, 14<sup>avo</sup> Coloquio, San Francisco (EEUU):451-59.
- Rafalski J., Tingey S., Williams J., 1991. *RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding*. AgBiotech News and Information 3(4):645-648.
- Rakotomalala J., Cros E., Anthony F., Noirot M., Charrier A., 1993. *Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers*. ASIC 15<sup>avo</sup> Coloquio, Montpellier (Francia):47-55.

- Ramírez H., Calderón A., Roca W., 1991. *Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal*. In: CIAT (Centro de Agricultura Tropical). 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cali (Colombia). 970p.
- Rodríguez H., 1992. *Uso de marcadores moleculares para la construcción de un mapa de ligamiento genético en cacao Theobroma cacao L.* Tesis Mg Sc. CATIE. 84 p.
- Tanksley S., Young N., Paterson A., Bonierbale M., 1989. *RFLP mapping in plant breeding - new tools for an old science*. Bio/Technology 7:257-264.
- Waugh R., Powell W., 1992. *Using RAPD markers for crop improvement*. Trends Biotechnol 10:186-191.
- Welsh J., McClelland M., 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic Acids Research 18(24):7213-7218.
- Welsh J., Honeycutt R.J., McClelland M., Sobral B.W.S., 1991. *Parentage determination in maize hybrids using the polymerase chain reaction*. Theor.Appl.Genet. 82:472-476.
- Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J., Tingey S., 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Research 18(22):6531-6535.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Protocolo utilizado para la extracción de ADN en café en el laboratorio. Modificado por Tanskley y Olman Quirós (1994).

1. Se hicieron colectas del material de café, escogiendo hojas de 1-2 años que estuvieran sanas y brillantes.
2. Se toman 5g de hoja sin peciolo (por su alto de fenoles) y se pulverizan rápidamente utilizando nitrógeno líquido para evitar la oxidación del material.
3. Se añade el buffer de extracción filtrando la mezcla para luego centrifugar a 4,000 RPM por 20 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y queda precipitado el ADN.
4. Se añaden 4 ml de buffer de extracción, 5 ml de buffer lisis y 1 ml de sarcosil.
5. Se agita la muestra y se coloca en tubos de policarbono para ponerlos a baño maría a 65°C por 1 hora.
6. Se añade cloroformo isoamílico [24:1] y se agita para precipitar las proteínas.
7. Nuevamente se centrifugan las muestras por 10 min a 8000 RPM donde se separan 3 capas: la muestra de ADN, el cloroformo y las proteínas.
8. Al sobrenadante (que contiene el ADN) se añade isopropanol frío en una cantidad igual a la obtenida. Se agita lentamente observando la formación de un hilo blancuzco correspondiente al ADN extraído.
9. Luego se extrae el ADN con una pipeta Pasteur y se hacen lavados con etanol 70 ó 90%. Después de 2-3 lavados se diluye en TE y se guarda en el congelador a -20°C.

Este ADN permite su conservación hasta por 2-3 años a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Después de este tiempo es mejor no utilizar el material.

Buffer de extracción (1 litro)

100 ml Tris HCl 1M y pH: 7.5

1 ml EDTA 0,5 M y pH: 7.5

5 g. Bisulfito de sodio.

pH final: 7.0

Buffer lisis (500 ml)

100 ml Tris HCl 1M y ph: 8.0

50 ml EDTA 0.5M

58 g. NaCl

10 g. CTAB

## ANEXO 2

Electroforesis en gel de agarosa. Verificación de la calidad de ADN.

La calidad se verifica haciendo una electroforesis en gel. El gel se prepara a partir de agarosa a 1.8% de concentración. Se diluye en el buffer que se utiliza para la cámara de electroforesis y es el mismo que se utilizó para la migración de los fragmentos de RAPDs. La metodología es muy sencilla: Se colocan muestras del ADN extraído en las celdas del gel y se ponen a migrar a 150V, aprox por 45 min - 1 hora. Luego se tiñen con bromuro de etidio y el resultado se ve en la lámpara de luz ultravioleta (UV).

Si se observa en el lugar de la muestra una mancha de blanca significa que el ADN está oxidado y no sirve para el trabajo con los RAPDs. Si se ve una banda que puede variar de intensidad (gruesa o delgada) significa que hay ADN. La cantidad de ADN se puede calcular con el fluorómetro o incluyendo un marcador (HIND III) que permite comparar la intensidad de la banda de ADN con bandas del marcador de peso molecular conocido.

## ANEXO 3

## Utilización del Fluorómetro TKO 100

**Soluciones****10X TNE Buffer concentrado (100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 2.0 NaCl, pH 7.4)**

Tris base            12.1 g

Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O    3.7 g

NaCl                116.8 g

El pH se ajusta a 7.4 con HCl concentrado. Se completa a un volumen final de 1 litro. Esta solución puede ser refrigerada y conservada por 12 meses.

**1X TNE Buffer de trabajo (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl, ph 7.4)**

Se prepara a partir del buffer concentrado diluyéndolo en relación 1:10, luego se filtra para remover cualquier partícula extraña.

Para 1 muestra (2 ml) se usan 0.2 ml Buffer 10X y 1.8 ml de H<sub>2</sub>O. Se debe proveer suficiente buffer para las muestras a determinar y 6 muestras para calibrar el fluorómetro más algunas repeticiones que se hagan necesarias.

**Stock concentrado (1 mg/ml en H<sub>2</sub>O)**

Hoechst 33258        10 mg

Agua destilada y filtrada 10 ml

Este stock concentrado se refrigera y protege de la luz permitiendo su conservación hasta por 6 meses.

**Solución A (0.1 µg/ml Stock conc. en Buffer de trabajo)** para muestras entre 10 ng/ml y 500 ng/ml de ADN.

Stock concentrado            10 µl (0,2 µl)  
 Buffer de trabajo            100 ml (2 ml) para 1 muestra

Esta solución se debe preparar el día que se va a usar.

### Procedimiento

1. El fluorómetro se enciende al menos 15 minutos antes de ser utilizado. Se debe asegurar que la perilla del CERO este girada totalmente a la izquierda.
2. Para el ensayo standard: preparar la solución de referencia (ADN standard). Si se usa ADN de timo de ternero preparado en una dilución 1:10 (100 µg/ml) así:

ADN standard (Calf Thymus) 1 mg/m.....100 µl  
 Buffer concentrado (10X TNE) .....100 µl  
 Agua destilada y filtrada.....800 µl

Esta mezcla puede ser refrigerada y almacenada hasta por 6 meses.

3. Ajustar la perilla SCALE hasta el 50% de su sensibilidad girándola 5 veces hacia la derecha o en el sentido de las manecillas del reloj.
4. Para el ensayo estandar se toman 2 ml de la solución A (sin ADN) en la cubeta perfectamente limpia por dentro y por fuera y se introduce en el fluorómetro.
5. Con esta solución se ajusta el CERO con la perilla correspondiente hasta que la lectura sea "000". La lectura fluctúa normalmente en +- 3 unidades alcanzando una 50% de la sensibilidad del fluorómetro.

6. Se pipetea 2  $\mu\text{l}$  del ADN estandar dentro de la solución de ensayo y homogenizando la mezcla con parafina. 2  $\mu\text{l}$  de 100  $\mu\text{g/ml}$  de ADN estandar en 2 ml de la solución A resultan en una concentración de 100 ng/ml.
7. Con esta solución que incluye el ADN se ajusta el "100" con la perilla SCALE indicando 100 ng/ml como la concentración máxima que ha de leerse con las muestras a determinar.
8. Luego se hace una curva de calibración. Es decir, la línea cuya ecuación determina la concentración de las muestras y su relación con las lecturas que da el fluorómetro. Esto se hace tomando las lecturas con 2  $\mu\text{l}$  de ADN estandar, luego 4  $\mu\text{l}$ , 6  $\mu\text{l}$  y 8  $\mu\text{l}$ . Las lecturas deben formar una línea recta que aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN. Se dibujan los puntos y se calcula la ecuación de la recta.

Esta ecuación de la recta permite convertir los valores de lectura de emisiones de luz que da el fluorómetro a cantidades de ADN encontradas por muestra.

9. Se introducen las muestras y se escriben los valores de lectura.  
Cada 10-12 muestras es bueno reconfirmar "el cero" del aparato usando la solución A (sin ADN) para verificar que la sensibilidad del fluorómetro no haya cambiado.

Nota:

El cero se ajusta cada vez que se introduzca la solución sin ADN. No se debe mover la perilla del "100" durante las determinaciones.



## ANEXO 4

### Preparación de las soluciones intermedias y de trabajo.

El trabajo con los RAPDs requiere de 10ng de ADN por tubo de PCR, así que las cantidades de ADN obtenidas con un buen método de extracción generalmente resultan suficientes para preparar las soluciones intermedias y de trabajo a partir de la solución stock.

Las soluciones intermedias tuvieron una concentración entre 50 y 100 ng/ $\mu$ l. Para ello se hicieron diluciones a partir del stock así: aquellas muestras con menos de 100 ng/ $\mu$ l en el stock se diluyeron a 1/2; aquellas con una concentración mayor de 100 ng/ $\mu$ l tenían una solución intermedia con 1/3 de la cantidad stock inicial.

Las soluciones de trabajo se obtuvieron a partir de las soluciones intermedias diluyendo individualmente cada muestra hasta obtener soluciones con 7 ng/ $\mu$ l.

La preparación de estos dos tipos de soluciones aseguró una mejor conservación del stock durante el tiempo de trabajo. Se minimizan los riesgos de contaminación y degradación del ADN durante el estudio de los RAPDs, ya que se manipulan diluciones preparadas a partir del stock y por lo tanto estas pueden ser reemplazadas en cualquier momento a partir del stock inicial. El stock se conservó a -20°C mientras que las soluciones intermedias y de trabajo se conservaron a 4°C.

Estas temperaturas aseguran una adecuada conservación del ADN.