



IICA/CreA/
PROCIANDINO/FRUTHEX

*Seminario internacional
Biotecnología aplicada
a la micropropagación
de frutales*

IICA
PROCIANDINO
101
1994
MFN-7582

SEMINARIO INTERNACIONAL BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA MICROPROPAGACIÓN DE FRUTALES (1994, MARACAY, VEN.). 1999. Memorias. Ed. por Félix J. Chirinos; Elio Pérez S. Maracay, Ven., Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura/ Centro Regional Andino/Programa Cooperativo de Innovación Tecnológica Agropecuaria para la Región Andina/Red Andina de Frutihorticultura de Exportación. 115 p.

**Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura
Centro Regional Andino
Programa Cooperativo de Innovación Tecnológica
Agropecuaria para la Región Andina
Red Andina de Frutihorticultura de Exportación**

*Seminario internacional
Biotecnología aplicada
a la micropropagación
de frutales*

Memorias

**Maracay - Venezuela
26 al 30 de septiembre de 1994**



This One



Digitized by Google
OAXF-E4X-2UY6

HECHO EL DEPÓSITO DE LEY
DEPÓSITO LEGAL If. 22319996301045

ISBN 980-318-124-6

IIIA
PROCRANDINO
707
7994
MFN - 7582

Presentación

Para IICA-PROCIANDINO es altamente satisfactorio haber contribuido a la realización del "Seminario internacional sobre biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales" y del "Curso internacional de certificación de cítricos", actividades a las cuales se les dio la debida y oportuna prioridad como una iniciativa tendente a establecer y fortalecer los nexos entre los grupos de trabajo en los diferentes países que laboran sobre la base de la temática propuesta.

El principal interés de IICA-PROCIANDINO es lograr de una amplia la difusión del conocimiento, como una forma de lograr la multiplicación del mismo a los diferentes niveles de participación. En este sentido se dan a conocer, a través de esta publicación, las diferentes ponencias elaboradas y presentadas a la consideración de los participantes por destacados especialistas en las diversas disciplinas, objetos de consideración en estas actividades.

IICA-PROCIANDINO busca que los participantes, tanto en el Seminario como en el Curso, trabajen en objetivos comunes, como una forma de lograr un mayor aprovechamiento de los recursos disponibles en el Área Andina y a la vez contribuir al mejoramiento y desarrollo de la explotación de frutales en la región, sobre la base de la obtención de materiales más productivos y adaptados a las condiciones de cultivo.

Contenido

Programa	7
La biotecnología en la agricultura. El caso venezolano	11
Biotecnología aplicada al cultivo de la piña	18
Plan nacional de certificación de material de propagación de cítricos	22
Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género <i>Musa</i>	30
Micropropagación y pruebas de compatibilidad injerto/patrón de tres especies de la Passifloraceae: <i>Passiflora edulis</i> var. <i>Flavicarpa</i> Degener, <i>P. Cincinnata</i> Mast y <i>P. caerulea</i> L.	32
La microinjertación de ápices caulinares de cítricos para la producción de plantas libres de virus	33
Micropropagación del guayabo (<i>Psidium guajava</i> L.)	39
Micropropagación de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.)	45
Control de la contaminación y oxidación fenólica en la propagación clonal <i>in vitro</i> del guayabo (<i>Psidium guajava</i> L.) clon Mara-7	49
Aislamiento y purificación de protoplastos de <i>Persea</i> spp.	51
Avances en la micropropagación de banano y plátano en Ecuador	53
Estado actual de la micropropagación de frutales en Ecuador	55
Aplicación de la biotecnología al cultivo del mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	62
Estado actual de la biotecnología aplicada a frutales en Bolivia	67
Transformación genética en lechosa (<i>Carica papaya</i> L.) para la incorporación de genes de resistencia a enfermedades	74
El cultivo de tejido como una herramienta para la propagación asexual y el mejoramiento de la lechosa (<i>Carica papaya</i> L.)	77
Uso de la biotecnología para la obtención de especies de frutales resistentes a nematodos	80
Mesa redonda sobre las perspectivas y posibilidades del uso de la biotecnología en la micropropagación y mejoramiento de frutales	91
Participantes	95
Curso internacional de certificación de cítricos. Informe	97



Seminario internacional sobre biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales

Maracay - Venezuela
26 al 30 de Septiembre de 1994

Programa

Lunes 26

Coordinador de la sesión: Ariadne Vegas

- 9:00 - 9:30 am **Inscripciones.** Entrega de credenciales y materiales del curso.
- 9:30 - 10:00 am **Instalación** del Seminario por parte del Gerente de tecnología del FONAIAP. *Dr. Amado Rondón.*
- 10:00 - 10:30 am **Palabras de apertura** por parte del Representante del IICA-PROCIANDINO. *Dr. Francisco Salcedo.*
- 10:30 - 11:00 am **Refrigerio**
- 11:00 - 12:00 m **La biotecnología en la agricultura. El caso venezolano.** *Dr. Asdrúbal Arcia.* CONICIT. Caracas
- 12:00 - 2:00 pm **Almuerzo**
- 2:45 - 3:30 pm **Producción de plantas haploides de especies frutales.** *Dr. Carlos Ascanio.* Facultad de agronomía. U.C.V. Maracay.
- 3:30 - 3:45 pm **Refrigerio**

Martes 27

Coordinación de la sesión: Miguel Alvarado Rodríguez

- 8:00 - 8:45 am **El programa de frutales del CIRAD y las posibilidades de realización de proyectos en conjunto con Latinoamérica.** *Dr. Claude Villaume.* CIRAD. FRANCIA
PIRON. ALAIN
- 8:45 - 9:30 am **Biotecnología aplicada al cultivo de la piña.** *Ing. Miriam Gallardo.* FONAIAP - LARA. Barquisimeto
- 9:30 - 9:45 am **Refrigerio**
- 9:45 - 10:30 am **Plan Nacional de certificación de material de propagación de cítricos** *Dr. Raúl Salazar.* Colombia.
- 10:30 - 11:15 am **Obtención de plantas de banano resistentes a sigatoka amarilla a través de cultivo de tejidos. Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género *Musa*.** *Dra. Eva de García.* Facultad de Ciencias. U.C.V. Caracas.

11:15 - 12:00 m	Micropropagación y pruebas de compatibilidad injerto/patrón de tres especies de la Passifloraceae: <i>Passiflora edulis</i> var. <i>Flavicarpa</i> Degener, <i>P. Cincinnata</i> Mast y <i>P. caerulea</i> L. Ing. Haydee Coromoto Briceño. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos. San Juan de los Morros.	9:30 - 9:45 am	Refrigerio
		10:30 - 11:15 am	Microinjertación de aguacate. Lic. Gustavo Saldaño. Maracay.
		11:15 - 12:00 m	Aislamiento y purificación de protoplastos de <i>Persea</i> spp. Ing. Ana Liendo. FUSAGRI. Cagua.
		12:00 - 2:00 pm	Almuerzo
12:00 - 2:00 pm	Almuerzo	2:00 - 6:00 pm	Visita a laboratorio comercial
2:00 - 2:45 pm	Programa de certificación de cítricos en California. Dr. Timothy Williams. Universidad de California. Riverside. USA.		
		Jueves 29	
			Coordinador de la sesión: Miriam Gallardo
2:45 - 3:30 pm	La microinjertación de ápices caulinares de cítricos para la producción de plantas libres de virus. Ing. Magally Luque. CENIAP. Maracay.	8:00 - 8:45 am	Avances en la micropropagación de banano y plátano en Ecuador. Fatima Macías. Ecuador.
		8:45 - 9:30 am	Estado actual de la micropropagación de frutales en Ecuador. Blga. Laura Muñoz. Perd.
3:30 - 6:00 pm	Práctica sobre microinjertación de cítricos y cultivo de segmentos de hojas de guayaba. Ing. Magaly Luque. CENIAP. Maracay.	9:30 - 9:45 am	Refrigerio
		9:45 - 10:30 am	Aplicación de la biotecnología al cultivo del mango (<i>Mangifera indica</i> L.). Ing. Efraín Salazar. Dpto. Biotecnología. CENIAP. Maracay.
8:00 pm	Acto Cultural		
Miércoles 28			
	Coordinador de la sesión: Magaly Luque	10:30 - 11:15 am	Estado actual de la biotecnología aplicada a frutales en Bolivia. Carmen Villarroel y Ladislao Vallejos. Bolivia.
8:00 - 8:45 am	Micropropagación del guayabo (<i>Psidium guajava</i> L.). Dra. Norka Mogollón. UCLA. Barquisimeto.	11:15 - 12:00 m	Micropropagación de manzanas. Dra. María Sol González. UCLA, Barquisimeto,
8:45 - 9:30 am	Micropropagación de guanábana. Dra. Silvia de Sieralta. LUZ. Maracaibo.	12:00 - 2:00 pm	Almuerzo

	Demostración de termociclador para técnicos de biología molecular de inmunolaboratorios. Pharmaciz Biotecl.	9:30 - 9:45 am	Refrigerio
		9:45 - 10:30 am	Usos de la biotecnología para la obtención de especies frutales resistentes a nematodos. Ing. Zoraida Suárez. CENIAP. Maracay.
2:00 - 3:00 pm	Visita Programa de cítricos del CENIAP. Coordinador: Ing. Magally Luque.	10:30 - 12:30 pm	Mesa redonda sobre las perspectivas y posibilidades del uso de la biotecnología en la micropropagación y mejoramiento de frutales. Coordinadores: Claret Michelangelli y Alba Nava.
3:00 - 6:00 pm	Práctica de cultivo de embriomes de frutales. Coordinador: Lic. Ariadne Vegas.		
8:00 pm	Acto cultural		
Viernes 30 - 9 - 94			
Coordinador de la sesión: Magally Luque			
8:00 - 8:45 am	Transformación genética en lechosa (<i>Carica papaya</i> L.) para la incorporación de genes de resistencia a enfermedades. El cultivo de tejido como una herramienta para la propagación asexual y el mejoramiento de la lechosa (<i>Carica papaya</i> L.). Lic. Ariadne Vegas. CENIAP. Maracay.	12:00 - 2:00 pm	Almuerzo
		2:00 - 4:00 pm	Conclusiones del seminario. Coordinadores: Efraín Salazar, Magally Luque y Ariadne Vegas.
		4:00 - 4:15 pm	Refrigerio
		4:15 - 5:15 pm	Entrega de certificados y palabras de clausura. Dr. Claudio Chicco. Director CENIAP. Dr. Francisco Salcedo. Representante Nacional del IICA-PROCIANDINO.
		5:15 pm	Brindis de clausura.

La biotecnología en la agricultura. El caso venezolano

Asdrúbal Arcia M.
Gerente General
Programa de Nuevas Tecnologías
CONICIT - Venezuela

Un poco de historia

La biotecnología Agrícola, en su forma más reciente, entra, oficialmente en Venezuela luego de la década de los '70, cuando se señala su aparición en el mundo como una nueva tecnología para producir plantas vía ingeniería genética. Sin embargo, antes de eso, y hacia finales de los '50 y principios de los '60, ya el Ing. Salomón Horovitz y la Dra. Dora Micheletti de Zerpa, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, habían hecho trabajos pioneros en la búsqueda de la resistencia al virus de la mancha anular de la lechosa (*Carica papaya*) por medio del cultivo *in vitro* de cruces entre la especie cultivada y la especie *C. cauliflora*, cruces que resultaban incompatibles, pero que por medio de esa técnica podrían ser factibles. Trabajando con técnicas muy rudimentarias, ellos lograron producir una planta que presentaba un buen nivel de resistencia, pero con frutos muy pequeños y de un extraño aroma.

Sirva este párrafo como un homenaje a esos pioneros.

Oficialmente, en el año 1981 se inician en el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Venezuela, CONICIT, reuniones de académicos, con la finalidad de explorar las potencialidades y necesidades

del sector Ciencia y Tecnologías en el área biotecnológica. Estas iniciativas cristalizan en el año 1984 con la presentación de un diagnóstico de la situación en biotecnología y con sugerencias en lo pertinente a las líneas de trabajo. En agosto de 1984, mediante el Decreto Presidencial No. 240, se crea la Comisión Nacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (CNIGB) la cual entre otras funciones, tiene la obligación de coordinar y efectuar un seguimiento al progreso de la Ingeniería Genética y la Biotecnología en Venezuela, así como asesorar al Gobierno Nacional en esta materia.

La CNIGB, en cumplimiento de sus funciones elaboró el Plan Nacional de Biotecnología, el cual centra su acción en tres áreas prioritarias, a saber: **Biomedicina, Agricultura e Industria.**

Para seleccionar los proyectos en las áreas mencionadas, la CNIGB, en primer lugar realizó un diagnóstico de las necesidades de cada área, utilizando estudios anteriores y datos recientes provenientes de la Oficina Central de Estadística e Información.

Con base en los resultados obtenidos, se señalaron áreas de acción específicas, relacionadas con sustitución de importaciones, mejoramiento de cultivos característicos y siste-

mas de diagnóstico de enfermedades de vegetales.

Otra iniciativa, también tomada desde el sector gubernamental ha sido la Red de Información en Biociencias para Latinoamérica y el Caribe (RIBLAC) asociada al Banco de Datos en Biotecnología, la cual se encuentra en desarrollo con sede en el IVIC y bajo los auspicios del CLAB-UNESCO y la OEA.

Venezuela es actualmente centro de varias iniciativas internacionales en Biotecnología y participa activamente con una gran cuota de responsabilidad en algunas de ellas. Por ejemplo, es Centro Afiliado al Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (Trieste-New Delhi) el cual funciona bajo los auspicios de la ONUDI y UNESCO. También, tiene la sede del Programa Regional de Ingeniería Genética y Biotecnología para América Latina y el Caribe, dentro del Acuerdo Básico de Cooperación entre el Gobierno Venezolano y la Universidad de las Naciones Unidas.

En 1988, Venezuela se incorpora al Proyecto de Altas Tecnologías de América Latina (ATAL-2000) auspiciado por la OEA, con el fin de efectuar estudios de prospectiva para desarrollar las nuevas tecnologías y entre ellas la biotecnología.

En ese mismo año, se inician las negociaciones del CONICIT con el Banco Internacional de Desarrollo (BID) para celebrar un contrato de préstamo para financiar proyectos y formación de recursos humanos en el Programa de Nuevas Tecnologías (PNT) el cual cuenta con cinco áreas prioritarias, siendo la de mayor impacto la Biotecnología.

En el Programa de Nuevas Tecnologías encontramos que era necesario dividir el área en varias subáreas, debido al interés que tienen en Venezuela:

Agrícola
Vegetal
Animal
Acuícola

Industrial
Fermentación
Producción de Alimentos
Producción de fármacos

Salud
Desarrollo de kits de diagnóstico
Producción de vacunas

Considerando nada más que la primera, **Biotecnología Agrícola Vegetal**, por ser el tema de nuestra exposición, en el PNT se hizo un estudio acerca del proceso de evolución de esa sub-área y llegamos a definir sin dar fechas precisas, tres etapas por cumplir.

Primera etapa

- Producción vegetal, propiamente dicha, la cual se inicia con el **cultivo de tejidos**.
- Microbiológica, que se inicia con trabajos en **control biológico**.

La parte de producción vegetal tiene entre sus objetivos más inmediatos la propagación masiva de especies vegetales de interés comercial, mejoramiento genético de algunas de esas especies y producción de material vegetal libre de enfermedades. Labores que se han venido realizando hasta ahora con diferentes cultivos.

La parte correspondiente a microbiología se inicia con los trabajos de control biológico usando aislamientos de hongos para el control de diferentes plagas y enfermedades.

En este momento sabemos cual es la situación actual de esta etapa y creemos que ya está bien consolidada por cuanto dispone de

un mínimo de infraestructura y de equipos necesarios, además de un recurso humano preparado para esas labores y el que se está preparando en estos momentos en distintas universidades del exterior, para enfrentar las otras etapas.

Segunda etapa

En una segunda etapa se pretende, en la parte de producción vegetal, iniciar los trabajos para la obtención de plantas tolerantes a condiciones extremas, como podrían ser problemas de salinidad, ciertas enfermedades del suelo, o bien la inducción de la producción de ciertas proteínas en mayor escala en algunos cultivares de maíz o de otro cereal.

En lo que corresponde a la microbiología, se pretende producir aislamientos de diferentes organismos (hongos, bacterias, virus y algunos insectos) con características de mayor agresividad y virulencia hacia las diferentes plagas y enfermedades de las diferentes especies vegetales y a otras especies, demás de seleccionar cepas de mayor adaptación a las condiciones, tanto climáticas como de manejo de los diferentes cultivos.

Esta segunda etapa se está apenas iniciando, por cuanto que se debía fortalecer la primera, ya se tienen algunos proyectos avanzados en el conocimiento de toxinas que puedan ser usadas para enfrentarlas a células o tejidos vegetales y así desarrollar materiales resistentes o tolerantes a esa acción. Todavía no se ha determinado si ese material es genéticamente estable.

Tanto en esta segunda etapa, como en la primera, encontramos que ya hay direcciones claras hacia una producción de carácter semi-comercial y comercial, conjuntamente con los trabajos de investigación que en ella se requieren.

La última encuesta realizada por nosotros, y publicada en el Directorio Latinoamericano de la Industria Biotecnológica, Área Andina, indica que en Venezuela más de 30 empresas dedicadas a la biotecnología o que han sido biotecnologizadas con el tiempo. Aparte, por supuesto, de los laboratorios de investigación propiamente dicha, que no llegan a la comercialización.

Tercera etapa

Esta etapa contempla el inicio del programa en los procesos de Ingeniería Genética. En la parte vegetal, la modificación más extrema de las plantas para lograr su adaptación a nuestras condiciones climáticas y la mejora en la producción de proteínas, y resistentes a enfermedades de origen viral. En la parte microbiológica, la producción de híbridos y mutantes más eficientes, el estudio de los fenómenos de fijación de nitrógeno y la acción de las micorrizas, además del aprovechamiento de los procesos de biodigestión, etc.

Avances reales en esta etapa, se encuentran en los resultados obtenidos en papas en el laboratorio de la Dra. Eva de García, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, aunque ya se anuncian trabajos en otros cultivos en instituciones como el FONAIAP-CENIAP, la Universidad de los Andes, y el IVIC.

Con esta historia en la mente, veamos ahora en cual posición nos encontramos, en primer lugar debemos aclarar que lo que queremos hacer, es **biotecnología vegetal** y sobre todo que esa o cualquiera otra biotecnología es **comerciable**. No podemos dejar de pensar en un proceso **utilitario** y de **producción de bienes y servicios**.

¿Cuál biotecnología?

A pesar de estar en el conocimiento de lo que es la biotecnología para todos nosotros, sería conveniente, para efectos de nuestra discusión, tratar de definir que es lo que se llama o se ha llamado biotecnología.

Cuando empezamos a trabajar en el Programa de Nuevas Tecnologías, decidimos adoptar la definición siguiente: **Grupo de Tecnologías resultantes de la aplicación de principios científicos y de ingeniería genética, al procesamiento de materiales, mediante la utilización de agentes biológicos, para la producción de bienes y servicios** (Bull, A. T., Holst, T., Lilly, M. D. OEDC Report, Sept. 1982), la cual se adaptaba casi exclusivamente a las llamadas tecnologías de punta.

Un análisis de la realidad venezolana, vista de acuerdo a los primeros doscientos (200) proyectos presentados hacia junio de 1989, en relación a la calidad y la cantidad de recursos humanos, infraestructura científico-tecnológica y el estado de desarrollo del área, indicó la conveniencia de extender su acción hacia las llamadas disciplinas básicas asociadas, como bioquímica, inmunología, microbiología, fisiología, fitopatología, entre otras, con lo cual se facilitaba la adaptación y/o mejoramiento de las tecnologías convencionales y su relación con la biotecnología moderna.

Esa decisión demostró su total validez al conocerse la nueva definición de biotecnología, producida por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1982) según la cual **Biotecnología es la aplicación de la Bioquímica, de la Biología, de la Microbiología y de la Ingeniería Química, a procesos industriales y productos (incluidos los productos para la atención a la salud, la energía y la agricultura) y al medio ambiente.**

Todas las definiciones coinciden en varios puntos, uno el de la multidisciplinaridad, otro el de la producción de bienes y servicios y finalmente el de la comercialización.

Sin embargo, y para nuestros efectos, debemos analizar lo que se quiere generar con la biotecnología:

Generación de conocimientos o

Generación de productos

La biotecnología que se hace en las universidades y centros de investigación tiende a ser generadora de conocimientos, mientras que la que se hace en la industria, tiende a ser la generadora de productos.

En nuestras condiciones, la generación de conocimientos ha imperado por sobre la generación de productos. Esto no es extraño, porque es así como se define la acción de ambos tipos de instituciones, pero lo que si no es correcto es que las dos vayan por caminos separados, en muchos casos ni siquiera paralelos.

Esto es lo que Zilinskas, R. A. ha llamado el eslabón perdido entre la investigación y sus aplicaciones:

En este trabajo se indica que la asistencia que se ha dado a la biotecnología en algunos países, y entre ellos Venezuela, se ha dedicado básicamente al incremento de las capacidades en la investigación, beneficiando a los científicos y sus instituciones, pero que no existe un eslabón entre los establecimientos de investigación y la industria o el sector de mercadeo, por lo que los resultados de la investigación no llegan al sector industrial.

Todo lo que hasta ahora hemos venido mencionando para Venezuela, viene a ser como un factor común para los países del área andina, nuestro conocimiento al respecto,

nos indica que si bien es cierto que existen algunas empresas dedicadas a los procesos tecnológicos, también es cierto que la relación investigación - empresa es sumamente limitada.

En los países industrializados la adquisición del conocimiento científico y de las nuevas tecnologías es de suma importancia, porque ello representa ser más competitivos tanto en los mercados nacionales como en los internacionales. Los gerentes de esas industrias dependen, cada vez más, de la ciencia y de la tecnología que se genera tanto interna como externamente para poder responder rápida y apropiadamente a las demandas diarias.

Si nuestra biotecnología quiere progresar deberá seguir ese camino y romper el mito de que nuestros científicos, ubicados en las instituciones públicas, son vistos como que tienen poco interés en los problemas de la vida real, y que sus servicios son difíciles de obtener porque se tienen muchas trabas de tipo burocrático.

La cultura biotecnológica

Esa relación empresa - universidad, en lo que a biotecnología se refiere, presenta algunos obstáculos debido tal vez a una falta de lo que hemos llamado la **Cultura Biotecnológica**.

Biotecnología, en el sentido más popular de la palabra, está ligada a los llamados seres de probeta, ya sean plantas como pueden ser los famosos bebés de probeta.

Es extraño, pero pareciera que la biotecnología humana tuviera más aceptación por parte del público en general, que la misma biotecnología vegetal, en el primer caso se aceptan los bebés de probeta como una salida a problemas de esterilidad, las vacunas como un problema de salud y muchos otros, pero todo

cuando se trata de la biotecnología agrícola se presentan muchísimos problemas para su aceptación.

Comparativamente hablando, la biotecnología agrícola tiene más posibilidades de producir impactos de tipo social que cualquiera otra de las biotecnologías actuales. En los países más desarrollados la producción de alimentos no es un problema y todos se logran por las vías convencionales, de tal manera que en ese caso la biotecnología está dirigida hacia la producción de kits de diagnóstico, plantas resistentes a plagas y enfermedades y a la incorporación de algunas características, como el incremento en los contenidos de betacarotenos, antioxidantes, y se habla de usar algunos productos comestibles como vacunas contra algunas enfermedades como la hepatitis.

En una conferencia celebrada recientemente se indicaba que la biotecnología agrícola en los países europeos tenía su mayor énfasis en la conservación del ambiente, mientras que en los países africanos el mayor énfasis debería ser hacia la producción de alimentos.

La pregunta es, ¿cuál debería ser el mayor énfasis de nuestros países en el área andina?

Pareciera que es una situación intermedia, la de producir alimentos de alta calidad y de altos rendimientos, considerando que las plagas y enfermedades en el trópico y en la región andina deben ser controladas de alguna manera diferente a como se controlan en los países más desarrollados, a fin de mantener el mayor equilibrio ecológico posible, para proteger nuestro ambiente.

Esto nos lleva a un razonamiento que alguien había propuesto anteriormente: el de que los países andinos, deben manejar una **biotecnología apropiada a sus necesidades** y no el de tratar de competir por sólo ocupar un puesto en las revistas internacionales.

Con esta preocupación en la mente, queremos dejar también una definición de lo que se ha llamado la **tecnología apropiada**:

«Tecnología apropiada puede ser definida como el conjunto de técnicas por medio de las cuales se utiliza, en forma óptima, los recursos disponibles en un ambiente determinado» (Morawetz, 1974, citado por Frances Stewart, «Technology and underdevelopment» The MacMillan Press Ltd.).

Regulaciones en la biotecnología

Este es un tema que debe ser de alta prioridad en nuestros países en donde ocurre la mayor diversidad genética del planeta; tanto los Estados Unidos de América, como de los países europeos se han establecido normas para la producción y liberación de organismos de origen biotecnológico, y en especial los productos de origen transgénico. Todas las pruebas, en esos países, se hacen bajo confinamiento del material experimental. Aparentemente nosotros todavía no estamos preparados para eso, y es así como en una reunión celebrada recientemente en Cartagena, Colombia, acerca de las Regulaciones que se podrán tener para la introducción de organismos transgénicos al medio ambiente, se pudo constatar que ningún país del área andina o del Caribe, tienen leyes que regulen esos productos, por su parte México, Brasil, Chile y Argentina ya han logrado introducir leyes de ese tipo en sus constituciones.

Esta es otra de las tareas que debemos emprender en nuestra área.

Quisiera referirme ahora a un aspecto de tipo más bien académico, como lo es el de:

La necesidad de los posgrados

En estos momentos no es difícil visualizar la necesidad que tenemos de conjugar esfuer-

zos no sólo por la creación de los llamados posgrados nacionales, sino también de los posgrados a niveles de regiones como la Andina o la del Caribe.

Los científicos de estas regiones ya no tienen el mismo acceso que se tenía antes el conocimiento de los países más desarrollados, hay limitaciones de tipo económico que impiden ese acceso, pero además ya se tienen otras limitaciones de carácter legal que nos ponen en situaciones de desventaja, es cierto que por muchas vías se pueden obtener las informaciones, pero también es cierto que cada día son más costosas. Por otra parte, la idea de la biotecnología no es la de hacer lo que los países desarrollados están haciendo, es hacer lo que necesitamos para aprovechar nuestras ventajas comparativas, nuestros recursos genéticos y eso es lo que previamente llamamos la biotecnología apropiada.

Como hemos visto, cada día es más difícil enviar uno de nuestros estudiantes a recibir ese conocimiento, pero no es difícil invitar a un especialista que venga a nuestro medio y logremos un efecto multiplicador mayor de ese conocimiento que podemos aprovechar. Esa opción es la que vemos como una de las mayores posibilidades para reforzar nuestros posgrados, organizar cursos de ese tipo en combinación con tutores nativos y sobre todo con material nuestro que pueda ser estudiado y desarrollado en función de la biotecnología.

Hemos tocado una serie de puntos que sabemos son de interés común en el área, tal vez sirvan para establecer una buena discusión al respecto, pero no queremos terminar sin mencionar algunos otros que actualmente nos preocupan y que serán motivo de próximas reuniones en nuestro programa.

Entre ellos tenemos:

El componente de difusión y transferencia

La ausencia de este componente es una barrera de carácter fundamental en el desarrollo de la biotecnología en nuestros países. Debe recordarse que hay necesidad de generar un producto y que ese producto debe ser puesto en el mercado.

La contradicción de la oferta y la demanda de la tecnología

Los centros de investigación ofrecen, de alguna manera, sus desarrollos, pero por razones que desconocemos, esas ofertas, en la mayoría de los casos, no se corresponden con la demanda que tienen las empresas.

Por ejemplo, hemos visto como en los centros de investigación se desarrollan, casi a diario, los protocolos de trabajo en diferentes especies vegetales; aquí nos encontramos con dos ofertas que no son requeridas por la industria: la primera es la de los protocolos y la segunda la de las diferentes especies vegetales, que por lo general no son comerciales. Por su parte, la industria ya tiene sus protocolos listos en las especies que le interesan,

pero requieren de medios de cultivo más económicos.

La relación de la biotecnología con otras áreas de investigación

En el proceso de generación de conocimiento, mientras más relación exista entre diferentes departamentos e instituciones, mayor será el éxito a obtener. En nuestro caso vemos como los biotecnólogos, o mejor los que hacen biotecnología, tienen una buena relación con los geneticistas o mejoradores vegetales, porque en la mayoría de los casos proceden de esas áreas, luego, por la misma formación, sigue la asociación con los estadísticos, ya que los resultados deben ser analizados de alguna manera, pero también hemos visto que existe poca relación con fitopatólogos, entomólogos, fisiólogos y con bioquímicos, sin contar, por ejemplo, con la falta de relación con médicos, etc.

Seguimiento y control del proceso biotecnológico

En este caso la pregunta es ¿qué esperamos y hacia dónde vamos en todo este proceso?.

Biotecnología aplicada al cultivo de la piña

Miriam Gallardo

*Ing. Agr. M. Sc. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara*

La piña representa un cultivo de gran importancia para zonas semiáridas, donde la siembra de otros cultivos se hace difícil debido a las condiciones agroecológicas imperantes, especialmente la baja precipitación. En Venezuela, la piña se siembra en el estado Lara, el piedemonte andino (especialmente de los estados Trujillo y Táchira) y algunas zonas de los estados nororientales (Sucre, Anzoátegui y Monagas).

El interés por este cultivo se ha incrementado ya que no solo tiene mercado como fruta fresca, sino que también es usado por la agroindustria y tiene grandes perspectivas para exportación. Sin embargo, los productores de piña tienen dificultad para cubrir las necesidades de «hijos» para la fundación de nuevas plantaciones, las cuales se estiman en aproximadamente 30 000 hijos/ha. Por otro lado, los frutos para la exportación y la agroindustria deben reunir ciertas condiciones de calidad que pueden lograrse a través del mejoramiento genético.

La biotecnología ofrece alternativas tanto para el abastecimiento de hijos para la expansión del cultivo, como para mejorar la calidad de los frutos. Usando las técnicas de cultivo *in vitro* es posible la micropropagación masiva de material para la obtención de hijos que pueden ser propagados en semilleros de piña para suplir las necesidades de los productores. El material a multiplicar puede ser selec-

cionado por sus características morfológicas, agronómicas, de producción y por su calidad fitosanitaria, de acuerdo a las exigencias del mercado nacional e internacional. Igualmente, se puede inducir la variabilidad genética en la búsqueda de mejores características agronómicas y de calidad del fruto.

Micropropagación de piña

Las técnicas de cultivo *in vitro* han contribuido notablemente a la producción de material de siembra de cultivos que se propagan vegetativamente. Algunos países usan estas técnicas en forma rutinaria para producir el material requerido para las siembras de piña. Este sistema presenta la ventaja de multiplicar en forma masiva y acelerada, material de siembra de alta calidad genética y fitosanitaria. Mathews y Rangan (1979) señalan tasas de multiplicación de 1:26 y 1:63, en 50 días de cultivo *in vitro* estacionario y rotativo, respectivamente, lo que hace del proceso un sistema muy eficiente de propagación. La técnica de micropropagación de piña comprende las etapas siguientes:

Selección del material

La Piña tiene la propiedad de producir yemas a diferentes niveles de la planta: en hijos de corona, basales, axilares y enraizados, las

cuales pueden ser utilizadas en micropropagación. Sin embargo, la experiencia parece indicar que los mejores resultados se obtienen a partir de yemas de hijos basales o de la corona del fruto recolectada dos meses después de la floración.

Desinfección

La desinfección del material que viene del campo es muy importante para evitar contaminación durante la micropropagación. Como paso previo a la desinfección, se eliminan las hojas del hijo seleccionado, se lavan con una solución de jabón azul y un cepillo suave a fin de eliminar restos de hojas e impurezas y se sumergen en la solución jabonosa por 15 minutos, en constante agitación, para luego enjuagar con agua destilada. Luego, se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio a 15%, durante 15 minutos, y seguidamente se enjuagan, por lo menos tres veces, con agua destilada estéril, dentro de la cámara de flujo laminar.

Disección

Una vez desinfectado el material, se procede a la disección de las yemas, las cuales están localizadas en la inserción de las hojas y tienen un tamaño aproximado de 3 mm. En esta etapa se deben cumplir las normas de asepsia, para evitar la contaminación. De una corona se pueden disectar entre 15 y 20 yemas.

Establecimiento

Las yemas disectadas se colocan en tubos de ensayo, con medio básico Murashige-Skoog, 1962 (MS-62), sin reguladores de crecimiento, y allí permanecen en observación durante cinco días, a fin de detectar la presencia de organismos contaminantes. Frecuentemente, la luz estimula la oxidación de compuestos orgánicos en las células durante las etapas iniciales del cultivo de tejidos meristemáticos,

como es el caso del cultivo de yemas, por lo tanto se recomienda mantener a los explantes recién disectados, con baja luminosidad o en oscuridad durante los primeros días del cultivo.

Ruptura de latencia

Para el cultivo *in vitro* de piña, se debe cumplir con una fase inicial de rompimiento de la latencia de las yemas, lo cual puede lograrse con la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo. En el caso de yemas provenientes de hijos basales de la variedad Española Roja, se puede lograr romper la latencia en aproximadamente 40%, adicionando 0,01 ppm de ácido naftalenacético, 1 ppm de benzilaminopurina y 0,1 ppm de ácido giberélico, al medio MS-62, semisolidificado con 4 g/l de agar. Las condiciones de cultivo son: fotoperíodo de 16 horas/luz, con una intensidad entre 3 000 y 4 000 lux y temperatura promedio de 26 °C.

Proliferación de yemas

Una vez establecida la yema bajo condiciones *in vitro*, y cuando haya alcanzado un tamaño aproximado de 2,5 cm (aprox. 3 semanas), se coloca en un medio de cultivo que induzca la ramificación o proliferación de brotes, para así lograr la multiplicación masiva. Este efecto se logra adicionando 2 ppm de ácido indolacético, 2 ppm de kinetina, 40 ppm de sulfato de adenina y 170 ppm de dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado, en medio MS-62. A las dos semanas, en medio líquido sin agitación se obtiene un promedio de 12 brotes/planta y en medio sólido de 4 brotes/planta, sin embargo, los brotes desarrollados en medio semisólido (4 g/l de agar) son más vigoroso en cuanto a tamaño, color y configuración. El tamaño promedio de los brotes desarrollados es de 3,5 cm en medio líquido y 6,5 cm en medio semisólido. Las condiciones de cultivo son las mismas que para la etapa anterior.

Alargamiento de los brotes

Con el objeto de facilitar la separación de los brotes para posteriores subcultivos o trasplantes al vivero, se requiere inducir el alargamiento de los mismos, lo cual se logra cultivándolos en el mismo medio de la etapa anterior, pero sin el sulfato de adenina, durante dos semanas. A fin de lograr la multiplicación masiva, los brotes pueden ser subcultivados nuevamente en medio de proliferación de brotes, repitiéndose el ciclo.

Aclimatación

Las plantas multiplicadas *in vitro* requieren de un manejo especial al pasar a condiciones *in vivo*, a fin de lograr la máxima sobrevivencia. En piña, el cultivo se desarrolla en ambientes muy adversos, por lo que es necesario que las vitroplantas cumplan con una etapa de acondicionamiento previo en una especie de vivero, en donde se les proporcionen las condiciones apropiadas de suelo, humedad y luminosidad, a objeto de evitar pérdidas de plantas en esta etapa de aclimatación al ambiente natural. La aclimatación de las vitroplantas puede hacerse en canteros o macetas de 1/4 kg; en canteros se puede usar una distancia de siembra de 15 cm entre plantas. Para mantener una alta humedad, se puede cubrir provisionalmente con tela blanca tipo permalina y aplicar riego cada cuatro días. La sobrevivencia en canteros puede estar alrededor de 90%, usando una mezcla de tierra y estiércol de chivo, en proporción 2:1. Cuando se incorpora arena a la mezcla en la misma cantidad que el estiércol, la sobrevivencia puede disminuir (aprox. 85%), aunque mejora el vigor de las plantas y el número y longitud de las raíces. A los 40 días, las plantas alcanzan un tamaño promedio de 7,5 cm en la mezcla sin arena, y 9,9 cm en la mezcla con arena.

Trasplante a campo

Una vez que las plantas tengan un tamaño aproximado de 20 cm, pueden ser sembradas definitivamente a campo. El trasplante a campo debe hacerse preferiblemente durante la época de lluvias y en las últimas horas de la tarde, para evitar el estrés y, de ser posible, aplicar un riego para garantizar la sobrevivencia de las plantas. Esta plantación debe manejarse adecuadamente para los fines de producción de "hijos", o sea, cumpliendo eficientemente con fertilización apropiada y control de malezas, plagas y enfermedades, para producir material de siembra de alta calidad y vigor. Es importante inspeccionar cuidadosamente la plantación, para detectar y descartar plantas fuera de tipo que posiblemente pudiesen producirse a causa de las condiciones de cultivo *in vitro*.

Conservación de germoplasma

El mantenimiento de germoplasma *in vitro* representa una alternativa que ofrece ventajas sobre el mantenimiento en campo, ya que comparativamente es menos costoso (si se tienen las instalaciones de laboratorio), se corre menos riesgo de perder el material por ataque de plagas y enfermedades o condiciones climáticas adversas, y necesita de poco personal y espacio físico para su conservación. Por otro lado, se facilita el traslado de material dentro del mismo país o a nivel internacional y se puede programar la producción masiva para determinada época, de acuerdo a los planes del fitomejorador. La conservación de plantas de piña bajo condiciones *in vitro* es bastante sencilla, ya que vitroplantas han logrado sobrevivir 80%, durante 12 meses en agua destilada estéril. Sin embargo, la sobrevivencia y el vigor de las vitroplantas mejoran cuando se usa un medio de cultivo semisólido preparado con 1/4 de las sales MS, los compuestos orgánicos completos y 3% de sacarosa. Bajo estas condiciones no se observa producción de callo.

Bibliografías

- CASALA, I.; GARCÍA, E. C. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. *ACEVIV*, 2:3-18.
- GALLARDO, M. 1988. Propagación de piña. En: Curso sobre el Cultivo de la piña. FONAIAP - Estación Experimental Lara. Barquisimeto, Venezuela. 138 p.
- GALLARDO, M. 1992. Informe de Gestión Anual 1991. (Mimeografiado). FONAIAP. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. Barquisimeto, Venezuela.
- GUTIÉRREZ, D. 1991. Aclimatación de Plantas de Piña *Ananas comosus* L. Merr. Provenientes de Cultivo *in vitro*. Trabajo especial de pasantías. Instituto Universitario de tecnología de Yaracuy. San Felipe, Venezuela. 90 p.
- MATHEUS, V. H.; RANGAN, T. S. 1979. Multiple plantlets in lateral bud an leaf explant in vitro cultures of pineapple. *Scientia Hortic.*, 11:319-328.
- MONTILLA DE BRAVO, I. 1992. El cultivo de la piña en la Región Occidental, En: Curso sobre Fruticultura Tropical (material de apoyo). Ed. por H. Tirado Sánchez. FONAIAP - Estación Experimental Monagas. Maturín, Venezuela. 184 p.
- PANNETIER, C.; LANAUD, C. 1976. Divers aspects de l'utilisation possible des cultures *in vitro* pour la multiplication végétative de l'*Ananas comosus* L, Merr., variété *Cayenne lisse*. *Fruits*, 31:739-750.
- ZEE, F.T.; M. MUNEKATA. 1992. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas spp.*) germplasm. *HortScience*, 27:57-58.

Plan nacional de certificación de material de propagación de cítricos *

Raúl Salazar Castro**
Consuelo Jaramillo Giraldo***

* *Contribución de CORPOICA Regional 5 y Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Palmira, al Seminario Internacional sobre la Biotecnología Aplicada a la Propagación de Frutales. Maracay, Venezuela. Septiembre 1994.*

** *Ing. Arg., M. Sc. C. Lide. Sc. Investigación Frutales CORPOICA, Regional 5 y Profesor Asociado Universidad Nacional Palmira.*

*** *Ing. Arg., M. Sc. Frutales CORPOICA, Regional 5, CI Palmira. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.*

Resumen

Los autores presentan la situación cítrica nacional, en especial áreas y especies sembradas, así como la problemática de las enfermedades virales existentes en el país. Hacen un recuento de las investigaciones y logros obtenidos hasta la fecha, e indican las actividades que se desarrollan en la actualidad. Presentan a la vez los primeros resultados obtenidos en el «Plan Nacional de Certificación de Material de Propagación de Cítricos», que aún cuando no completos, sí permiten el inicio de una citricultura más eficiente y productiva; justifican también la importancia de continuar con el plan y mantenerlo en forma permanente, única forma de asegurar materiales fieles al tipo y libres de enfermedades, para bien de la citricultura nacional.

Introducción

Colombia está ubicada en el extremo noroccidental de América del Sur a 4°13'30" latitud sur y 12°26'46" latitud norte, entre los meridianos 66°50'54" y 79°02'33" al oeste del meridiano de Greenwich, con costas en los océanos Atlántico y Pacífico.

Por encontrarse en zona de bajas latitudes, Colombia posee un clima tropical que se ve alterado por la altura sobre el nivel del mar. Presenta una gran variación de climas y microclimas, debido a su sistema montañoso, acompañado por los vientos alisios y otros de carácter local. A medida que se asciende, la temperatura disminuye a razón de 1 °C por cada 178 metros, aproximadamente. De esta forma, Colombia no posee estaciones, ya que en cada región el promedio de temperatura es uniforme durante todo el año.

Según los pisos térmicos, el mayor porcentaje del área del país (81,7%) corresponde al clima cálido, que va de 0 a 1 000 m.s.n.m. y 9,1% al clima medio, de 1 000 a 2 000 m.s.n.m., Cuadro 1.

En estos dos pisos térmicos, con una extensión total de algo más de 103 millones de hectáreas (90,8% del área nacional), se encuentran cultivados los cítricos en el país.

Aún cuando no existen estadísticas reales del área sembrada con cítricos en el país, un censo realizado por el Programa Nacional de Frutales del ICA en 1993, donde se consultó los Centros Regionales de Extensión, Capa-

citación y Difusión de Tecnología Agropecuaria (CRECED) del ICA y se consideraron las áreas comerciales reportadas por la Asociación Nacional de Productores de Cítricos, ASOCITRICOS, los Comités de Cafeteros y la Federación Nacional de Cafeteros, se estima que en el país existen 39 027 ha sembradas con estas especies, (Cuadro 2) de las cuales 38% son cultivadas con tecnología (Salazar y Jaramillo, 1994).

Cuadro 1. Superficie colombiana, según pisos térmicos.

Piso térmico	Altura m.s.n.m.	Temp (°C)	Hectáreas	%
Cálido	0 - 1 000	> 24	93 257 025	81,7
Medio	1 000 - 2 000	18-24	10 365 550	9,1
Frío	2 000 - 3 000	12-18	7 576 350	6,6
Muy Frío	3 000 - 4 000	6-12	2 778 000	2,4
Subalpino	> 24	> 6	187 775	0,2
Total			114 174 800	100

Cuadro 2. Área citrícola colombiana (1993).

Departamento	Tecnificada		No tecnificada	Total
	Zona cafetalera	No cafetalera		
Antioquia	669	150	700	1 519
Risaralda	1 500		1 500	3 000
Caldas	1 466		1 500	2 966
Quindío	932		1 000	1 932
Valle	2 500	800	3 000	6 300
Cundinam	750	200	1 800	2 750
Santander	400	100	1 500	2 000
Tolima	600	300	1 300	2 200
Meta		1 800	760	2 560
Zona caribe		1 000	6 000	7 000
Otros	1 500	300	5 000	6 800
Total	10 317	4 650	24 060	39 027

El restante, 62% corresponde a los llamados «huertos caseros», que se caracterizan por ser árboles de semilla, sembrados sin criterio comercial y donde la tecnología usada es nula. Esto trae como consecuencia una baja productividad, una mezcla de calidades y un mercadeo deficiente, dada a que se presentan picos de producción en cada una de las áreas cítricas.

La producción cítrica se estima en 574 000 t, de las cuales 75% (450 000 t) corresponden a naranja, 10% (60 000 t) a limas ácidas y 15% restante a mandarinas, tangelos y otras, Cuadro 3.

Cuadro 3. Producción nacional de cítricos, 1993.

Especie	Tonelada	%
Naranja	450 000	75
Lima Ácida	60 000	10
Mandarina	55 000	9
Tangelo	30 000	5
Otras	6 000	1
Total	547 000	100

Prácticamente la totalidad de la producción se mercadea en fresco. Sólo un pequeño porcentaje de la naranja producida se procesa en forma de concentrados y jugos, no existiendo estadísticas al respecto. Igualmente, Colombia ha iniciado exportaciones de concentrados y, fruta fresca, ha realizado despachos al exterior de limas ácidas, Grapefruit y Tangelo, siendo estas especies las que podrían en un futuro competir en el mercado internacional de frutas frescas. Los resultados obtenidos al presente con las exportaciones de concentrados, indican el potencial de nuestro país para entrar en este tipo de mercados.

En el proceso de modernización de la industria cítrica de Colombia el mayor obstáculo es el material de propagación. El cultivador está sujeto a los riesgos de viveros que expenden material de variedades y patrones no fieles a los parámetros internacionales y portadores de dos o más enfermedades causadas por virus o similares. Las prácticas de cultivo ofrecen un paliativo al problema pero su respuesta sería mayor ofreciendo más eficiencia, rentabilidad y sobre todo longevidad de los cultivos, si los árboles estuviesen sanos.

Materiales y métodos

El Programa de Frutales del CIA, en el pasado y el Grupo de Investigación de la Regional 5 de CORPOICA, en el presente, han realizado investigaciones con las tecnologías imperantes en cada época, buscando el establecimiento de un servicio de producción de material de propagación de cítricos certificados.

En 1964 se hizo el primer intento sobre legislación y funcionamiento del Programa de Certificación de Yemas de Cítricos en Colombia bajo la responsabilidad de los investigadores Giacometti y Ríos Castaño (1965).

En 1966 se estableció un proyecto de rejuvenecimiento y saneamiento de variedades de cítricos mediante la obtención de clones nucelares (Giacometti y Ríos Castaño, 1967) los cuales terminaron contaminándose de nuevo y su efecto benéfico no alcanzó a llegar a todos los productores.

Para 1991 se replanteó el problema y su solución (Salazar y Jaramillo, 1988) en los términos siguientes:

- Selección de árboles madres de las variedades de importancia comercial. Selección programada en varias etapas que in-

cluyen viveros comerciales cuyos huertos madres se formaron con material básico producido por el ICA, Centros de Investigación y cultivos tradicionales, antiguos, de materiales criollos obtenidos de semilla en donde se presume cierto grado de sanidad y una alta diversidad que permite el florecimiento de individuos de características agronómicas excepcionales.

Los parámetros a evaluar son: Desarrollo físico, productividad, calidad y longevidad.

- Indexación de árboles madres a enfermedades de origen viral.
- Eliminación de enfermedades causadas por virus por medio de microinjertación de ápices caulinares.
- Conservación de plantas libres obtenidas por microinjertos.
- Caracterización biológica de razas del virus de la tristeza.
- Conservación de razas y aislados del CYV de los cítricos.
- Preinmunización de plantas libres de virus con una raza protectora de CTV.
- Evaluación agronómica de plantas preinmunizadas.
- Bloques de multiplicación rápida de yemas.
- Producción comercial de semillas de patrones para cítricos.

Resultados y discusión

Como resultado de los primeros trabajos desarrollados por el ICA y específicamente de

«Obtención de Clones Nucelares», se han entregado 15 variedades de cítricos todas ellas nucelares, Cuadro 4. (Salazar *et al*, 1988).

Sin embargo, por un manejo inadecuado y desconocido para la década del 60 y 70, en varios casos los materiales se contaminaron. Vale la pena resaltar acá el problema existente con el CTV, ya que materiales limpios obtenidos por medio de clones nucelares fueron llevados al campo, donde en poco tiempo, adquirieron la Tristeza, por ser ésta endémica y transmitida por áfidos.

En la época del trabajo, se desconocía la tecnología de preinmunización así como la evaluación de razas débiles.

Debido a la anterior, se reinició la limpieza de materiales o Plan Nacional de Certificación, donde se involucraron las tecnologías existentes, en especial la microinjertación para la liberación o limpieza de copas y la preinmunización con razas suaves del virus.

Al presente, con el «Plan de Certificación» se han logrado algunos resultados.

En la actividad «Selección de Árboles Madres» por sanidad y características agronómicas, mediante el análisis de más de 30 años de información y observaciones directas en el campo y laboratorio, se seleccionó y multiplicó el mejor árbol de 100 variedades de cítricos, Cuadro 5. (Salazar y Jaramillo, 1994).

Éstos se mantienen en casa de malla, sembrados en materas, con el único fin de mantener el germoplasma y multiplicarlo cuando sea necesario.

Dado que la Tristeza de los Cítricos (CTV) es endémica en el país, la actividad No. 2, «Indexación de árboles madres a enfermedades sistémicas» no se realizó, pues se asumen que todos los árboles están afectados del virus y deben someterse a limpieza.

Cuadro 4. Variedades de cítricos entregadas por el Programa de Frutales del ICA a Diciembre de 1992.

Variedad	Rango de adaptación m.s.n.m	Año de entrega
Naranja Palmira Ruby	0 - 1 000	1967
Naranja Salerma Valencia	0 - 1 200	1967
Naranja ICA Hamlin		
Nucelar 7	0 - 1 600	1986
Naranja Galicia	800 - 1 400	1967
Naranja Lerma	800 - 1 600	1967
Naranja ICA Parson		
Brown Nucelar-8	800 - 1 600	1990
Naranja Valle		
Washington	1 000 - 1 800	1967
Mandarina Oneco Nuc.	800 - 1 400	1967
Naranja ICA Jamundi	800 - 1 400	1963
Mandarina ICA Amaime	800 - 1 400	1969
Mandarina ICA Bolo	800 - 1 400	1969
Lima Acida Tahití Nuc.	0 - 1 800	1968
Toronja ICA Hatico	0 - 1 200	1969
Toronja ICA Manuelita	0 - 1 200	1969

Fuente: Programa Frutales, ICA 1992.

Cuadro 5. Especies y números de variedades donde se ha seleccionado el árbol madre. Palmira 1994.

Especie	No. variedad
Naranja	43
Mandarina y Similares	29
Lima Acida	4
Limón	7
Grapefruit	15
Pomelo	5
Ornamentales	7
Total	110

La actividad No. 3, «Eliminación de enfermedades sistémicas por medio de la microinjertación», se inició desde 1992 y a la fecha se tienen materiales injertados y algunos limpios de Tristeza y otras virosis.

Para seleccionar el mejor patrón para realizar los microinjertos, se evaluaron 4 materiales trifoliados (Citranges C-35, Carrizo, Troyer y el trifoliado Pomeroy), obteniéndose los mejores resultados con el Citrange Troyer.

Como resultado de esta actividad, básicamente se tienen, libres de enfermedades virales, una variedad de naranja (ICA Hamlin Nucelar 7), dos de tangelos (Minneola y Orlando), dos de lima ácida (Tahití y Pajarito) y dos de grapefruit (Star Ruby y Red Blush), Cuadro 6.

Cuadro 6. Número de variedades micro-injertadas, según la especie y probadas para CTV y Psorosis. Palmira 1994.

Especie	No. variedad	Probadas	
		CTV	Psorosis
Naranja	8	3	1
Mandarina	2	-	-
Híbridos	4	2	2
Lima Acida	2	2	2
Grapefruit	4	2	2
Pomelo	1	-	-

La comprobación de la ausencia del virus Tristeza se hizo por la técnica de ELISA y el test biológico, usando como indicadores la lima ácida «Pajarito o Mexicano», la del grupo Psorosis por indexing biológico usando como indicadoras tangor Dweet y la naranja criolla Salerma. La determinación de exocortis está en proceso utilizando el clon de Citron Arizona 861 S1.

La enfermedad conocida como Cachexia, aún no reportada en el país, está en proceso de prueba usando la indicadora mandarina Parson's Special.

Bajo la actividad «Caracterización biológica de razas del virus Tristeza», se ha recolectado 26 aislados en 6 especies y en diferentes zonas de Colombia, Cuadro 7.

Las pruebas realizadas hasta ahora en lima ácida Mexicana (*Citrus aurantifolia*) han demostrado que existen en el país razas severas de CTV, pero además hay cinco aislados

promisorios en proceso de caracterización que permitirán avanzar en la entrega de material (Salazar y Jaramillo, 1994).

Cuadro 7. Aislados de CTV en evaluación. Palmira 1994.

Especie	Número	Origen
Naranja	3	Valle y Costa Atlántica
Mandarina	1	Santander
Tangelo	7	Zona Cafetera - Valle
Lima Acida	11	Zona Cafetera - Valle
Limón	1	Costa Atlántica
Grapefruit	3	Valle

La preinmunización de material sano con una raza protectora de CTV se hará con áfidos, para lo cual ya se cuenta con una colonia de *Toxoptera citricidus* libre de la enfermedad.

Los diferentes aislados de CTV se han separado de otros virus y viroides portados en la yema original por medio de la colonia de *Toxoptera* ya mencionada y se conservan en casa de malla en plantas de naranja dulce Salerma.

Otra actividad donde ya se tienen resultados y que permite usar una tecnología para producción de material, es «Campos de multiplicación de yemas certificadas». Esta actividad iniciada en mayo de 1991 con cinco variedades de cítricos, una de lima ácida, una de tangelo y tres de naranja, ya cumplió su objetivo. Esto permite que una vez se inicien los Bloques de multiplicación de material certificado, se pueda planear con exactitud, tanto por

parte del viverista, como de la Corporación, la fecha de injertación y la disponibilidad de cualquier cantidad de yemas, en el momento preciso de injertación. El Cuadro 8, presenta el número de yemas producidas por metro cuadrado de terreno en 12 meses de cosecha (cuatro cortes).

La actividad «Producción Comercial de Semilla de Patrones» ya está en desarrollo. De trabajos previos de evaluación de patrones, se han seleccionado 17 clones, por su comportamiento a las condiciones del trópico, y su notable efecto sobre producción, calidad y desarrollo del árbol, así como por comportamiento al *Phytophthora*, hongo del suelo causante de la gomosis.

Estos patrones han sido evaluados, adaptados y recomendados por el ICA, en más de 30 años de investigación que se continúa haciendo en diferentes localidades y tipos de suelo en el país. Se espera que en un año se inicie la venta comercial de semilla, lo que sin duda alguna solucionará uno de los mayores problemas actuales, ya que muchos viveristas deben importar la semilla, presentando ésta problemas de adaptación que, en la mayoría de los casos, sólo se manifiestan varios años después de instalado el huerto.

La mayoría, si no todas las actividades en desarrollo son permanentes, ya que siempre existe la posibilidad de seleccionar nuevos y mejores materiales nacionales y foráneos, que requieren de todo el proceso para producir material certificado. Además, se corre el riesgo de nuevas infecciones de las plantas libres y/o preinmunizadas, haciéndose necesaria la limpieza nuevamente.

Conclusiones

Los cítricos presentan una alternativa de producción comercial de frutas, tanto para consumo nacional como para exportación, ya sea como fruta fresca o procesada.

La incidencia de enfermedades de tipo viral, con la Tristeza de los cítricos a la cabeza, disminuye la producción, desmejoran la calidad y disminuyen la longevidad de los árboles.

Ante este problema es necesario, para lograr una citricultura eficiente y productiva, la producción de material de propagación, tanto de patrones como de copas o variedades, fieles al tipo y libres de enfermedades, que aseguren al citricultor éxito en su empresa.

Cuadro 8. Número de yemas obtenidas por metro cuadrado, en 12 meses de cosecha (4 cortes). Palmira, 1994.

Tipo Vareta	L.A. T. Tahití	Minneola	N. ICA Parson	N. Gar. Val.	N. Val 1 DE
Delgada	196	107	83	76	109
Triangul.	494	307	309	181	306
Redonda	481	75	432	79	82
Total	1 171	489	824	336	497

Bibliografía

GICACOMETTI, D. C.; RÍOS CASTAÑO D. 1967. Programa de Certificación de yemas para propagación de cítricos en Colombia. *Agric. Trop. Colombia*. 23(5):277-287.

GICACOMETTI, D. C.; RÍOS CASTAÑO D. 1995. Cómo deberá funcionar el Programa de Certificación de Yemas de Cítricos en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 8p. (inédito).

SALAZAR, C. R.; JARAMILLO de G. C. 1994. Situación de la Circultura Nacional.

Reunión de Coordinadores Nacionales. Red Interamericana de Cítricos. (RIAC). Kingston, Jamaica. 12p.

SALAZAR, C. R.; TORO, J. C.; ESCOBAR, W. 1988. El ICA y la investigación sobre frutales en Colombia. Enfoque, realizaciones, proyecciones y servicios. Curso Nacional sobre Frutales de clima cálido. Vol. 1. Palmira, Colombia. p. 11.

SALAZAR, C. R.; JARAMILLO de G. C. 1988. Plan nacional de sanidad de cítricos para Colombia, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Palmira, Colombia 55 p.

Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género Musa

Eva de García

El mejoramiento de musáceas a través de métodos convencionales presenta ciertas dificultades, por lo cual la aplicación de técnicas biotecnológicas ha sido señalada como una alternativa complementaria en este proceso.

El banano y el plátano presentan una gran irregularidad en la producción de semillas que impiden los procesos de hibridación, debido a problemas de esterilidad masculina y femenina, donde la mayoría de las musáceas comestibles son triploides, por lo tanto son asexuales. Las características señaladas hacen que el género Musa presente una serie de dificultades que difícilmente son controlables dentro del marco del mejoramiento tradicional.

Una de las enfermedades del banano para la cual se requiere con urgencia mejoramiento genético es la denominada *Cercospora musea* en su fase asexual y *Mycosphaerella musicola* en su fase sexual.

El ataque por Sigatoka Amarilla a las plantaciones de banano ha traído como consecuencia que la economía de los productores de musáceas se haya visto seriamente afectada debido al incremento acelerado en el costo de las prácticas agronómicas y culturales realizadas para el control de enfermedades como la Sigatoka Amarilla. Por esa razón, la obtención de variantes somaclonales, que exhiban

resistencia a esta enfermedad, constituye no sólo una ventaja para el productor venezolano, sino también para la economía de los países productores de musáceas.

El objetivo principal de este trabajo consistió en la obtención de somaclones variantes que exhibieran resistencia a la Sigatoka Amarilla. Con este propósito se utilizaron las técnicas biotecnológicas siguientes: el uso de concentraciones relativamente altas de citocininas para la inducción de brotes adventicios, la inducción de embriogénesis somática indirecta (a partir de la base de las hojas y de inflorescencias) la utilización de presión de selección, mediante un medio derivado, el homogeneizado y extractos crudos del hongo causantes de la enfermedad.

El material vegetal de este trabajo consistió en cuatro clones de banano con diferente susceptibilidad a la enfermedad, un clon diploide denominado Titiaro (AA) (altamente susceptible) dos clones triploides conocidos como Pineo Gigante y Brasileiro (AAA) (medianamente susceptible); y un clon Tetraploide (AAAA) igualmente denominado (CENIAP 81) (resistente) Los clones Titiaro, Pineo Gigante y Tetraploide fueron seleccionados del banco de germoplasma del CENIAP, con asesoramiento de los respectivos especialistas; mientras que el clon Brasileiro fue obtenido a través de FUSAGRI, bajo estas mismas condiciones.

Para la inducción de brotes adventicios se utilizaron concentraciones de una citocinina (BAP) las cuales fueron incrementadas paulatinamente de 5 mg/l a 15 mg/l en tres multiplicaciones sucesivas. Resultados satisfactorios fueron obtenidos a través de esta metodología con el cual se obtuvo un somaclon proveniente del clon denominado Brasileiro (AAA), que presenta características de resistencia a la Sigatoka Amarilla, y ha sido denominada "Reina". Adicionalmente, plantas del clon Titia-ro, regeneradas a partir de este proceso presentan un grado de resistencia mayor a la enfermedad que las obtenidas por métodos convencionales.

Con relación a la inducción de embriogénesis somática, ésta se logró al utilizar 2,4 D como fuente de auxina y la base de las hojas como explante. El desarrollo del proceso fue diferente para cada uno de los clones utilizados. Las plantas generadas a partir de embriogénesis somática presentaron una menor susceptibilidad a la enfermedad respecto a las plantas de la misma variedad obtenida por métodos tradicionales.

La aplicación de presión de selección se realizó en callos embriogénicos y plántulas obtenidas *in vitro* de los clones seleccionados, empleando como agente selectivo el

medio derivado del cultivo del hongo y un homogeneizado del mismo, a dos concentraciones diferentes (15 y 30% v/v) Adicionalmente a nivel de plántulas se utilizó el método de doble capa con el mismo objetivo. En estas experiencias, la fase sexual del hongo (*Mycosphaerella musicola*) resultó más apropiada para ser utilizada como agente selectivo, ya que permitió la discriminación de los explantes que exhibían mayor susceptibilidad ante el mismo.

Las plantas obtenidas a partir de las metodologías señaladas anteriormente fueron evaluadas a nivel de propagadores, vivero y campo, lo que permitió establecer comparaciones en cuanto a su desarrollo y comportamiento que presentaban ante el ataque de la Sigatoka Amarilla.

Los resultados de esta investigación constituyen un antecedente de suma importancia para los estudios relativos al mejoramiento de la enfermedad Sigatoka Negra, de recientemente introducción en nuestro país, la cual constituye una de las enfermedades que mayores daños ocasionan a las plantaciones comerciales de musáceas, debido a la severidad de su ataque al follaje de la planta, disminuyendo notoriamente la capacidad productiva de las plantaciones.

Micropropagación y pruebas de compatibilidad injerto/ patrón de tres especies de la Passifloraceae: *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* Degener, *P. Cincinnata* Mast y *P. caerulea* L.

Haidee C. Briceño G.

Posgrado en Agronomía

Universidad Central de Venezuela – Universidad Rómulo Gallegos

Facultad de Agronomía – San Juan de Los Morros

En la presente investigación se trabajó con tres especies de Passifloras: *P. edulis* var *Flavicarpa* Degener, *P. cincinnata*, y *P. caerulea*, desarrollando los protocolos de micropropagación y las pruebas de compatibilidad injerto-patrón bajo condiciones de cobertizo. En lo concerniente a *P. cincinnata*, se logró cubrir todas las fases del proceso de micropropagación. Las vitroplantas llevadas a ambiente abierto mostraron un excelente vigor, y llegaron hasta florecer pero no a fructificar. En un año, aparentemente se puede incrementar la tasa de multiplicación aproximadamente 30 veces (3 000%), usando la micropropagación en vez de la propagación tradicional por estacas de tallo. Todos los explantes de *P. cincinnata* obtenidos *in vitro* y subcultivados en otros medios, bajo las mismas condiciones, mostraron caracteres organogénicos. Para *P. edulis* var *Flavicarpa* Degener, no fue posible desarrollar el protocolo de micropropagación completo, debido a la ausencia de respuestas organogénicas satisfactorias para casi todos los explantes y medios utilizados. Sólo al utilizar segmentos de hojas con el haz hacia el medio de cultivo, se produjeron aparentes brotes inconspicuos, que no desarro-

llaron completamente. Es probable que la parcial imposibilidad de variar las condiciones de incubación, en particular el fotoperíodo, pudiera haber limitado las respuestas. Referente a *P. caerulea*, las respuestas organogénicas obtenidas fueron aun más escasas. Explantes obtenidos de hojas, sometidos a tratamiento de frío (aprox. 10 °C) e incubados a bajas temperaturas (aprox. 15 °C) permitieron la formación de numerosos iniciales de brotes. Aparentemente sus requerimientos ecológicos, en términos de fotoperíodo y temperatura, fueron la mayor limitante. Para todas las especies, el uso de los fitoreguladores de crecimiento: BAP, GA3, AIB, combinados, en los dos medios básicos usados (Nitsch y Nitsch; Scorza y Janick) permitieron respuestas organogénicas positivas, Aunque no fueron satisfactorias en todos los casos. En las pruebas de compatibilidad injerto/patrón, observamos que la combinación más promisoría fue la de *P. edulis* var *Flavicarpa* Degener como copa y *P. cincinnata* como patrón. Dos de las plantas injertadas fueron llevadas a un ambiente abierto, y se llegó a observar floración y fructificación.

La microinjertación de ápices caulinares de cítricos para la producción de plantas libres de virus

Magally J. Luque y Efrain G. Salazar

Departamento de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) - Venezuela.

Introducción

Las plantaciones comerciales de cítricos han sufrido de una reducción en la productividad debido a la incidencia de enfermedades, principalmente de aquellas de origen viral y/o viroidal. Dentro de las enfermedades causadas por virus o viroides en cítricos, deben señalarse a la Tristeza de los cítricos, Psorosis, Exocortis, Cachexia-Xiloporosis, entre otras. De este grupo, responsable de gran parte de las pérdidas sufridas en los rendimientos, la primera es de transmisión biológica, teniendo como vector principal a un grupo de áfidos, entre éstos destaca *Toxotera citricidus*. Las restantes son de transmisión mecánica o a través de las semillas, principalmente, lo que las ha ubicado dentro del grupo de enfermedades virales o viroidales de «difícil transmisión».

A fin de mejorar la productividad de las plantaciones, los citricultores deben basar sus plantaciones en materiales desprovistos de los agentes causantes de estas enfermedades, aunados a prácticas que permitan controlar y/o reducir al máximo la diseminación de las mismas. En este sentido, la obtención de materiales libres de agentes virales o viroidales sirve de control para las llamadas enfermedades de «difícil transmisión», mientras

que para aquellas transmitidas por agentes biológicos, están enfocando sus estrategias de protección hacia una posible protección cruzada (Ochoa y Trujillo, 1994) o por resistencia genética al ataque de los patógenos (Lee y col, 1994) Sin embargo, cualquier programa de control debe realizarse con plantas desprovistas de los respectivos agentes patogénicos, por lo que la producción de materiales libres de virus es una necesidad.

A pesar de existir diferentes mecanismos para la obtención de materiales libres de virus, tales como la termoterapia (Calavan *et al.*, 1972; Nylaand y Goheen, 1969) o el uso de plantas de origen nucelar (Rangan *et al.*, 1968; Bitters *et al.*, 1972) la microinjertación de ápices caulinares ha sido utilizada como una de las alternativas más eficientes en la obtención de materiales cítricos desprovistos de agentes virales o viroidales (Navarro *et al.*, 1975) ya que es una metodología efectiva para erradicar patógenos, tales como el viroide de la Exocortis, partículas imposibles de eliminar mediante el uso de cualquiera de las técnicas mencionadas (Murashige *et al.*, 1972) Del mismo modo, la microinjertación previene problemas de reversión de las plantas producidas a estados juveniles, limitante que ha frenado el uso extensivo de las plantas de origen nucelar.

Metodología para la microinjertación

La microinjertación consiste en la injertación de un meristema caulinar, de aproximadamente 0,5 mm de longitud, sobre un patrón, preferiblemente de 14 a 18 días de haberse sembrado *in vitro*. En este sentido, para el desarrollo de programas de microinjertación se hace necesario contar con un sistema de producción *in vitro* de los portainjertos y de los meristemas apicales.

Selección de los patrones

En el caso de las cítricas, y por los problemas de compatibilidad entre los microinjertos y los portainjertos, es imprescindible hacer una buena selección del portainjerto. Se ha especificado, que generalmente la mayoría de los meristemas de cítricos de cualquier tipo, a excepción de las limas y limones, presentan un buen desarrollo al ser microinjertados sobre patrones de citranger trifoliados. Las limas y limones tienen mejor desarrollo al ser microinjertados sobre patrones de limón rugoso.

El uso de patrones trifoliados presenta la ventaja adicional de permitir la distinción temprana entre el crecimiento del microinjerto y el desarrollo de brotes del tejido del portainjerto.

Las semillas que darán origen a los patrones deberán provenir de frutos en estado intermedio de maduración (pintones) las cuales se desinfestarán siguiendo procedimientos estándar en cultivo *in vitro*, posteriormente a la eliminación de las cubiertas seminales. Las semillas ya desinfestadas se colocan en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 25 ml de medio de cultivo compuesto de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con tiamina, pirodoxina y ácido nicotínico a 1 mg/l cada uno, mio-inositol 100 mg/l y 30 g/l de sacarosa desprovisto de reguladores de desarrollo, con el pH ajustado a

5,80 ± 0,02. Las semillas deben sembrarse parcialmente hundidas y con el orificio de salida de la plúmula hacia arriba.

Es necesario observar la morfología de la semilla, una vez finalizada la desinfección. Aquellas semillas que hayan alterado su forma (generalmente arrugamiento de la superficie) o presenten coloraciones oscuras, no deberán usarse en el proceso, ya que las plántulas que se desarrollan a partir de ellas presentan alteraciones morfológicas que impiden su uso como portainjerto.

Los tubos sembrados se colocarán en la oscuridad a 27 °C. Entre 14 y 18 días posteriores a la siembra se seleccionarán, como portainjertos, aquellas plántulas de color blanco, y que no presenten deformaciones en el desarrollo de la parte aérea o radical. A este respecto, se hace necesario observar la altura promedio de las plántulas desarrolladas, a fin de evitar la selección de material muy etiolado, lo cual representa una desventaja para el éxito de la microinjertación. Generalmente, a los 14 días posteriores a la siembra, las plántulas deben haber alcanzado una altura promedio de 5-6 cm.

Preparación de los meristemas apicales

Paralelamente a la siembra de las semillas de los patrones, se procede a la defoliación de ramas de las plantas donadoras de meristema o ápices caulinares, para inducir la formación de brotes tiernos. Generalmente, el proceso de formación de brotes tiernos toma 15 días, lo cual permite coordinar la siembra *in vitro* de las semillas y la inducción de los brotes que proveerán los meristemas para la microinjertación. A los 15 días se seleccionarán los brotes tiernos, de coloración verde claro uniforme, a los cuales se les eliminará cualquier resto de insectos, hojas o contaminantes que puedan presentar. En algunos casos, el proce-

so de inducción de brotación puede acelerarse mediante el uso de citocininas. Puede utilizarse la adición, en cada yema, de una gota de solución de benciladenina (BA) 1 mg/l, lo cual acelera el proceso de formación de brotes tiernos, en aquellos materiales en los que el proceso lleve más de 15 días.

Microinjertación de ápices caulinares

Los ápices caulinares seleccionados, se lavan en agua jabonosa y se sumergen en etanol 70% durante un minuto, finalmente se lavan con hipoclorito de sodio 10% de una solución comercial durante 5 minutos, y ya bajo condiciones de flujo laminar de aire estéril se lavan tres veces con agua destilada esterilizada.

Los portainjertos seleccionados, bajo campana de flujo laminar, se descapitan a 2 cm por encima del cuello de la raíz, eliminándose los cotiledones, y a 4 cm por debajo del cuello. A 1 mm desde la superficie superior de corte se hace una incisión en forma de T invertida de aproximadamente 1 mm de longitud. Los meristemas caulinares extraídos de los brotes tiernos, reducidos a secciones de 0,5 mm de longitud (domo meristemático y dos primordios foliares) se colocan en el interior de la T invertida, procurando el máximo contacto entre la base del meristema y la superficie del portainjerto.

Los patrones ya microinjertados se colocan en tubos de ensayo conteniendo 25 ml de medio líquido MS suplementado con tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, cada uno a 1 mg/l, sacarosa 75 g/l y benciladenina (BA) 1 mg/l (Navarro y col., 1975) Los microinjertos se cultivan bajo luz fluorescente a una irradiancia de 16,95 W. m⁻² y una temperatura de 25 °C.

Los meristemas microinjertados comenzarán a formar hojas verdes 15 días posteriores al

proceso anterior, aproximadamente. Una vez formado el brote, a fin de acelerar el ritmo de crecimiento de la planta, se procede a la reinjertación del mismo, sobre patrones vigorosos creciendo en potes. El proceso de reinjertación se realiza siguiendo técnicas estándar de injertación, adaptando gradualmente el microinjerto a las condiciones de humedad ambiental mediante el uso de bolsas plásticas.

Detección de virus

A fin de corroborar el éxito de la microinjertación debe descartarse la presencia de partículas virales en las plantas generadas. Se dispone de metodologías, tales como:

- Pruebas biológicas
- Test ELISA
- Pruebas moleculares

Las pruebas biológicas consisten en extraer inóculos de las plantas microinjertadas e impregnar con el extracto plantas altamente susceptibles al patógeno seleccionado, lo cual permitirá el desarrollo rápido de síntomas en las plantas impregnadas con extractos que contenían partículas del patógeno. Otra posibilidad dentro de las pruebas biológicas, es la injertación de yemas de las plantas microinjertadas en patrones altamente susceptibles a los virus estudiados, y esperar por la aparición de los síntomas en aquellos injertos cuyas copas sean portadoras del patógeno.

Las pruebas ELISA permiten, mediante el uso de anticuerpos específicos para los virus importantes en cítricas, una detección rápida de los mismos, permitiendo, a su vez, el análisis relativamente rápido de gran cantidad de materiales (Fishman *et al.*, 1983) Se han diseña-

do sistemas de anticuerpos, tanto monoclonales (Permar *et al.*, 1990; Vela *et al.*, 1988) como policlonales (Marco y Gumpf, 1991) para detección serológica de razas de virus de la tristeza de los cítricos. Mediante reacciones colorimétricas, producto del reconocimiento de enzimas ligadas al anticuerpo, permiten la detección de los materiales contaminados con el virus. Aquellas muestras que posean partículas de CTV, se acoplarán al anticuerpo, el cual lleva consigo acoplada moléculas de una enzima (generalmente fosfatasa ácida o peroxidasa) Al agregar el substrato, específico para cada enzima, las muestras donde esté acoplado el anticuerpo, y por ende poseedoras del virus, desarrollarán una coloración, casi siempre amarilla, lo cual se traducirá en un aumento de la absorbancia de luz a 405 nm. Las muestras sanas no presentarán aumento de la absorbancia.

Las técnicas moleculares permiten, del mismo modo, una detección rápida de partículas virales o viroidales. En este caso se aíslan las partículas de ácidos nucleicos (ARN o los ARN de doble cadena, típicos de la replicación viral) mediante extracción en columnas de celulosa (ARN de doble cadena) posterior a una separación fenólica (Duran-Vila *et al.*, 1986) Las partículas se separan electroforéticamente en geles de agarosa 1%, y se compara la aparición de los fragmentos del tamaño molecular, esperando una partícula viral. En este caso, la técnica sólo puede aplicarse en aquellas partículas que previamente han sido aisladas, purificadas y caracterizadas electroforéticamente. En el caso de cítricos, ha sido importante el uso de estas metodologías para la detección y caracterización de razas de Exocortis (Gillings *et al.*, 1991).

Consideraciones finales

La microinjertación de ápices caulinares es una herramienta eficiente para la producción

de plantas libres de virus, por lo que debe implantarse como técnica obligatoria de apoyo a cualquier programa de certificación de plantas. Es un proceso laborioso que requiere de la supervisión constante de los materiales, ya que se debe estar pendiente de la formación de brotes, sobretodo de aquellos originados del tejido patrón.

Es importante recalcar la importancia del estado fisiológico de los explantes, especialmente los meristemas caulinares, para el éxito del proceso de microinjertación. A este respecto, el uso de portainjertos desarrollados *in vitro* uniformiza la condición fisiológica de los patrones, quedando al cuidado del microinjertador, la selección, como fuente de meristemas, de brotes tiernos sin síntomas aparentes de estrés, provenientes de plantas en buenas condiciones fisiológicas. En caso de decidirse a usar meristemas provenientes de yemas auxiliares, es conveniente observar el comportamiento de estos microinjertos, en relación al desarrollo mostrado por los microinjertos provenientes de meristemas caulinares terminales. La condición fisiológica de ambos tipos de meristemas (caulinares y axilares) no necesariamente es la misma, y puede establecer diferencias significativas en el comportamiento *in vitro* de ambos tipos de materiales.

Finalmente, la manera de colocación del explante en el microinjerto ha sido otro aspecto en el que se ha puesto un gran esfuerzo, ya que de este factor dependerá, en buena parte el éxito práctico de la microinjertación. Hasta la presente fecha, se ha impuesto el uso de la T invertida, a un costado del portainjerto como la metodología más eficiente. En algunos laboratorios, especialmente en el caso de Cuba, se coloca el microinjerto en un orificio triangular. Entre los aspectos cruciales a considerar está el contacto físico entre la superficie de corte en el portainjerto y la base del meristema caulinar. Debe haber un buen contacto o «pegue» entre ambos, a fin de

garantizar un flujo efectivo de nutrimentos, agua y fotosintetizados para el desarrollo futuro del meristema. Del mismo modo, debe evitarse la pérdida de los microinjertos producto de la desecación, lo cual es garantizado por los dos métodos de colocación de los meristemas, anteriormente mencionados.

Al insertar un eficiente programa de microinjertación en los programas de certificación de plantas, y garantizar la producción de materiales libres de enfermedades virales o viroidales, se está impulsando el aumento de la productividad en las plantaciones comerciales, y por ende la satisfacción de la demanda de productos agrícolas, que en el caso de los cítricos se mantiene elevada a nivel mundial.

Referencias bibliográficas

- BITTERS, W. P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. 1972. Investigations on establishing virus-free citrus plants through tissue culture. 267-271 p. In W. C. Price (ed.) Proc. 5 th. Conf. Intern. Org. Citrus Virol. Univ. Fl. Press. Gainesville.
- CALAVAN, E. C.; OLSON, E. O.; CHRISTIANSEN, D. W. 1972. Transmission of the stubborn pathogen in *Citrus* by leaf-piece grafts. 11 - 14 p. In W. C. Price (ed.) Proc 5 th. Conf. Int. Citrus virol. Univ. Fl. Press. Gainesville.
- DURAN-VILA, N.; FLORES, R. y SEMANCIK, J. S.. 1986. Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. *Virology*, 150:75-84.
- FISHMAN, S.; MARCUS, R.; TALPAZ, H.; BAR-JOSEPH, M.; OREM, Y.; SALMON, R.; ZOHAR, M. 1983. Epidemiological and economic models for spread and control of citrus tristeza virus disease. *Phytoparasitica* 11:39-49.
- GILLINGS, M. R.; BROADBENT, P.; GOLINOW, B. I. 1991. Viroids in Australian citrus. Relationship to Exocortis, Cachexia and Citrus Dwarfing. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:559-570.
- LEE, R. F.; BAKER, P.S.; ROCHA-PEÑA, M. A. 1994. Citrus tristeza virus (CTV): an introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation in Central America and the Caribbean. International Institute of Biological Control. Centre de Agriculture and BioSciences (CAB) International and Food and Agriculture Organization (FAO), United Kingdom.
- MARCO, G. M. y GUMPF, D. I. 1991. A simple technique for the production of highly specific polyclonal antisera for citrus tristeza virus. In Proceedings of the Eleventh Conference of the International Organization of Citrus Virologist IOCV. R. H. BRLANSKY, R. F. LEE and L. W. TIMMER (eds.) Riverside. University of California. 77-81 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- MURASHIGE, T.; BITTERTS, W. P.; RANGAN, E. M.; NAUER, C. N.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *HortScience* 7:118.119.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. 1975 Improvement of shoottip Grafting *in vitro* for virus-free Citrus. *J. Amer. Hort. Sci.* 100(5):471-479.

- NYLAAND, G. y GOHEEN, A. C. 1969. Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7:331-354.
- OCHOA, F: y TRUJILLO, G. 1994. Selección de razas débiles del virus de los cítricos (CTV) con fines de protección cruzada en Venezuela. *Anales de Botánica Agrícola* 1:79-87.
- PERMAR, T. A.; GARNSEY, S. M.; GUMPF, D. J. y LEE, R. E. 1990 A monoclonal antibody that discriminates strains of tristeza virus. *Phytopathology* 80:224.
- RANGAN, T. S.; MURASHIGE, T. y BITTERS, P. 1968. *In vitro* initiation of mucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. *HortScience* 3:226-227.
- VELA, C.; CAMBRA, M; SANZ, A. y MORENO, P. 1988. Use of specific antibodies for diagnosis of citrus tristeza virus. 55-61 p. In: Proc. 10th. Conf. IOCV. riverside.

Micropropagación del guayabo (*Psidium guajava* L.)

Norca Mogollón
Ing. Agr. M. Sc.

Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un árbol frutal que pertenece a la familia de las Myrta-ceas y se considera la especie más valiosa dentro de su género. Originario de América Tropical con su centro de expansión en América Central, donde existe la mayor cantidad de formas (5 y 24). Se encuentra naturalizado en todas las regiones tropicales del mundo en una franja comprendida entre los 0° Latitud Norte y Sur del Ecuador, distribuido desde el nivel del mar hasta los 1 200 m de altitud y en un régimen de humedad desde los 100 a 3 700 mm, lo que demuestra su rusticidad (5).

El cultivo del guayabo, a partir de la década de los ochenta, ha venido adquiriendo una gran importancia económica, debido fundamentalmente al aumento en la demanda nacional e internacional de sus frutos, tanto para consumo fresco, como en la elaboración de productos procesados, entre ellos: mermeladas, compotas, dulces, jaleas, etc. (18) En este sentido, la producción en el país se ha incrementado a un ritmo acelerado en los últimos años, de tal modo, que para 1989 la superficie sembrada en el municipio autónomo Mara del estado Zulia, superaba las 2 000 ha, con una producción de 36 000 t (9) No obstante, según proyecciones estadísticas de Avilán *et al* (3), el déficit en la producción de

frutos para el año 1990, estaría por el orden de 90%. Este hecho, aunado con la tendencia a desarrollar una fruticultura con miras a la exportación, plantea la necesidad de utilizar métodos y técnicas de propagación asexual capaces de garantizar un número adecuado y suficiente de plantas para fundar nuevos huertos frutícolas con material proveniente de individuos preseleccionados.

Propagación convencional

Hasta el presente, los métodos de propagación convencional que han sido señalado a nivel mundial son: 1) Sexual, a través de semilla botánica y 2) Asexual, por estacas, acodos e injertos.

Sexual: las drupas del guayabo contienen una gran cantidad de semillas monoembríonicas que representan hasta 2% del peso del fruto, las cuales son usadas como propágulos, constituyendo el método más común de propagación (5) Sin embargo, la gran variabilidad de tamaños, formas y color de los frutos que exhiben las plantas procedentes de semi-llas, impide que este método pueda ser utilizado para perpetuar algunas características de interés. Por tanto, la propagación sexual queda limitada a la obtención y evaluación de nue-

vos clones y plantas para ser usadas como portainjertos (15 y 25).

Asexual: el guayabo ha sido propagado a partir de estacas de tallo y de raíz; no obstante, ambos tipos presentan limitaciones. Las de tallo requieren el uso de un propagador de neblina y la aplicación de reguladores de crecimiento para obtener un aceptable porcentaje de estacas enraizadas. Las de raíz presentan la dificultad en la obtención del material vegetal (5).

La mayoría de las investigaciones se han realizado con estacas de tallo, utilizando los tipos de madera dura, semidura, blanda y chupones; así como diversos estimuladores del enraizamiento, entre ellos: AIB, ANA y AIA. Los resultados han sido variables. En este sentido, Kilany y Gabr (14) señalan haber obtenido 81,4% de enraizamiento en estacas de madera semidura con 2 500 ppm de AIB; mientras que Sánchez *et al* (25) obtuvieron 88% en estacas provenientes de ramas chupones con aplicaciones de 200 ppm de AIB por 30 minutos. No obstante, la mayoría coincide en que los mejores porcentajes de enraizamiento se logran utilizando estacas de madera blanda con tres a cuatro hojas y aplicaciones de auxinas entre 2000 y 2500 ppm (6, 22 y 23) pero difieren en la respuesta ante el tipo de auxina empleada, ya que algunos registran mejor enraizamiento con AIB (6) otros con ANA (22) y otros con AIA (23).

Cañizares (5) señala que el acodado no es el método más conveniente para la propagación asexual del guayabo, ya que se obtienen plantas con un sistema superficial y escaso, recomendando que sólo debe usarse cuando no hay patrones disponibles. Así mismo, Nelson (20) afirma que este método no permite una producción de las plantas a gran escala a partir de una limitada fuente de material vegetal y que su única ventaja radica en que las plantas formadas crecen en sus propias raíces.

Los logros alcanzados mediante la injertación de esquejes y yemas en el guayabo, han sido muy variables e impredecibles. Los mejores resultados se han obtenido con el uso de yemas de madera verde, cuadrangular y semiligificada. Sin embargo, este método presenta la limitación de que para obtener buena suplencia de material vegetal a partir de plantas adultas, hay que despojarlas hasta de 1/3 de su superficie foliar productiva. Además los portainjertos procedentes de semilla, poseen gran variabilidad que puede ser conferida al injerto. Por tanto, las plantas resultantes no pueden ser consideradas uniformes (5, 20 y 25).

Micropropagación

Virtualmente, todos los frutales de clima templado de importancia económica han sido objeto de micropropagación por el método de cultivo de ápices caulinares, con cierto grado de éxito (10) pero con relación a los frutales tropicales perennes, los logros más notables se han conseguido en aquellas especies donde la poliembrionía nucelar ocurre en forma natural (16) Sin embargo, desde comienzos de la década de los ochenta se han señalado trabajos de micropropagación en frutales como el aguacatero, el merey y el guayabo, utilizando la técnica de proliferación de brotes a partir de ápices caulinares y segmentos nodales. En lo que respecta al guayabo, las primeras investigaciones se iniciaron en la India en 1986 y en Sur África en 1989. En ambos casos se utilizaron cultivares propios de la región, lográndose algunos aciertos (1, 2, 4, 7, 11, 12, 17 y 21).

Amin y Jaiswal (2) y Loh y Rao (17) señalan que la micropropagación del guayabo podría utilizarse como una técnica eficiente y deseable para propagar clonalmente genotipos preseleccionados y al mismo tiempo, complementaria de los métodos convencionales de

propagación, ya que cada uno de ellos tiene sus limitaciones y el número de plantas obtenidas es reducido.

A continuación se discutirán algunos factores que hasta el presente han sido objeto de estudio en la micropropagación del guayabo.

La explanta: en la micropropagación del guayabo se han utilizado principalmente dos tipos de explantas: ápices caulinares y segmentos nodales. Los primeros constituidos por un meristema apical con varios primordios foliares; los segundos, formados por una o dos yemas axilares con una pequeña porción de tallo. En ambos casos el tamaño de la explanta ha sido por lo general de 10 a 20 mm de longitud. (1, 2, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 17 y 21).

Amin y Jaiswai (1) recomendaron la utilización de segmentos nodales para la micropropagación de árboles adultos de guayabo, ya que lograron mayor tasa de proliferación de brotes con relación a los obtenidos por Jaiswal y Amin (12) al usar ápices caulinares. Esto se debió, probablemente, a la ausencia de la dominancia apical y a la presencia de yemas axilares en mayor estado de desarrollo en los segmentos nodales.

En la selección de la explanta se han considerado ciertos parámetros, entre ellos: origen, tamaño, posición, estado fisiológico, edad ontogenética, etc., debido a que pueden afectar el comportamiento o respuesta de las explantas. En cuanto a los dos últimos parámetros, la literatura señala que los tejidos juveniles frecuentemente son mejores fuentes de explantas que la de los tejidos maduros y que uno de los obstáculos para la regeneración *in vitro* de especies leñosas, es la falta de juvenilidad en árboles adultos (26) En este sentido, Loh y Rao (17) trabajando con ápices y segmentos nodales de guayabo a partir de plántulas, obtuvieron mayor tasa de regeneración de brotes en presencia de bajas concentraciones de BA o en su ausencia, en compara-

ción con los ápices y segmentos nodales provenientes de plantas injertadas de seis meses de edad, con las cuales hubo necesidad de utilizar mayores concentraciones de BA para lograr una tasa aceptable de multiplicación. Así mismo, demostraron que el potencial morfogénico de estos tejidos era superior al de los ápices y segmentos nodales tomados de plantas adultas cultivadas *in vitro* por Amin y Jaiswal (1 y 2) Los brotes provenientes de explantas de material juvenil dieron 100% de enraizamiento en el primer repique, en ausencia de auxinas; mientras que los brotes formados de explantas tomadas de material adulto, fueron necesarios hasta 10 repiques para lograr 90% de enraizamiento y en presencia de una combinación de auxinas (2).

Medio de cultivo y etapas de la micropropagación: en la propagación clonal *in vitro* del guayabo, mayormente se ha utilizado con éxito el medio modificado de Murashige y Skoog (19) al igual que en casi todos los frutales leñosos (26) Así mismo, se han implementado las tres etapas señaladas por esos mismos autores: a) Establecimiento aséptico de las explantas en un medio de cultivo o fase de inducción de brotes, b) Proliferación de brotes que abarca la multiplicación y elongación y c) Formación de raíces en los brotes micropropagados.

En la fase de inducción y proliferación de brotes se ha demostrado que las aplicaciones de citocininas al medio de cultivo, pueden inducir la formación de brotes en yemas laterales de las explantas, reprimiendo la dominancia apical. En el caso de frutales tropicales, específicamente el guayabo, varios investigadores afirman que el uso de citocininas a bajas concentraciones (0,1 a 1,0 mg/l) incrementa el porcentaje de explantas con brotes y el número de brotes por explanta. A su vez, la presencia de auxinas y/o giberelinas, adn a bajas concentraciones (0,01 y 0,1 mg/l) retardan o inhiben el crecimiento de los brotes

y a 1,0 mg/l, los detiene y necrosa. De esta manera, los mayores éxitos se han obtenido con el empleo de 1 mg/l de BA, en ausencia de auxinas y giberelinas (1, 2, 11, 12, 17).

En la fase de multiplicación muchas veces los brotes no alcanzan un tamaño adecuado para inducir la formación de raíces en la tercera etapa, por lo que una transferencia de dichos brotes a un medio fresco con una concentración más baja de citrinas, ha permitido un rápido crecimiento de los brotes y aumentado el número de brotes útiles para el enraizamiento. Éste es el caso de las explantas provenientes de ápices y segmentos nodales de árboles y plántulas de guayabo, donde una reducción de BA de 1,0 mg/l ha demostrado ser el mejor tratamiento en la segunda etapa de cultivo (17 y 21).

En la tercera etapa, los brotes son inducidos a emitir raíces por lo general en un medio con la mitad de la concentración de las sales de M.S., excluyendo las citocininas e incorporando las auxinas. En tal sentido, Jaiswal y Amin (11 y 12) y Amin y Jaswal (1) obtuvieron buen enraizamiento en los brotes de explantas provenientes de árboles adultos de guayabo, utilizando el medio M.S. a la mitad de su concentración y en presencia de la combinación de ANA e IBA a 0,2 mg/l cada una; mientras que Loh y Rao (17) lograron enraizar adecuadamente los brotes de explantas provenientes de plántulas germinadas *in vitro* y de plantas injertadas de seis meses de edad empleando el medio de M.S. a su concentración completa y sin necesidad de emplear auxinas.

Transferencia de las vitroplantas al suelo: la transferencia al suelo de las vitroplantas de guayabo, se ha logrado en forma satisfactoria. La mayoría de los investigadores reportan una etapa de aclimatación de dos a tres semanas, manteniendo una alta humedad relativa en los primeros días de su trasplante al pote. La mezcla recomendada en casi todos los trabajos está compuesta de suelo y

compost en producción 1:1 (1, 2, 11 y 12) y en algunos, sólo compost (21) En todos los casos las vitroplantas han alcanzado un porcentaje de supervivencia entre 70 y 90% (1, 2, 11, 12, 17 y 21).

Limitaciones en la propagación del guayabo

En la propagación *in vitro* del guayabo se han presentado algunas limitantes, entre ellas se mencionan las siguientes:

La contaminación en la fase de iniciación: esta limitante es verdadera, especialmente cuando la fuente de material vegetal proviene de árboles adultos establecidos en el campo. Al respecto, se han conducido investigaciones utilizando varios agentes desinfectantes, tales como el cloruro de mercurio, hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio y etanol, en diferentes concentraciones y tiempos, y se ha cuantificado su efecto a través del porcentaje de cultivos libres de contaminación y brotación de las yemas. La mayoría de los resultados coinciden en que al emplear material adulto, el agente más efectivo para reducir la contaminación sin afectar la brotación, es el cloruro de mercurio 0,05% por dos o tres minutos, combinando con la utilización de etanol 70% por un minuto (1, 2, 4, 11, 12 y 13); mientras que cuando se usa material juvenil, el empleo de etanol 70% ó 80% por cinco minutos, seguido por hipoclorito de sodio de 5 a 10 minutos, controla la contaminación adecuadamente (13 y 17).

La oxidación fenólica: La oxidación fenólica en las explantas de guayabo provenientes de material adulto es muy marcada, produciendo el necrosamiento de los tejidos y muerte de las mismas. Para superar este inconveniente, Amin y Jaiswal (2) midieron el efecto de siete tratamientos para remover los fenoles y lograr una mayor supervivencia de los culti-

vos. Los mejores resultados fueron obtenidos cuando las explantas se colocaron en una solución de PVP 0,5% y sacarosa 2% durante 30 a 40 minutos en agitación a 100 ppm y posteriormente, una rápida inmersión de las mismas en una solución antioxidante de ácido cítrico y ácido ascórbico 75:50 mg/l, previo al cultivo. Fitchet (8) utilizando solamente esta última solución antioxidante y dejando secar las explantas por 30 minutos antes de cultivarlas, logró reducir la oxidación y aumentar la supervivencia. Así mismo, el realizar dos o tres cambios de las explantas a medio fresco sin reguladores, antes de ser cultivadas al medio definitivo, ha permitido la exudación fenólica de las mismas y mejorado el porcentaje de éxito; de igual modo que adicionar 5 g/l de PVP al medio de cultivo (1, 2, 11 y 12).

Esta limitación se presenta en menor grado al utilizar explantas de material juvenil. Papadatou (21) trabajando con ápices de plántulas, señaló no haber tenido problemas de necrosamiento en los tejidos, debido probablemente a que en dichas plántulas aún no se habían sintetizado suficientes fenoles.

Conclusiones

- Existe un potencial considerable para la propagación *in vitro* del guayabo *Psidium guajava* L.
 - Los ápices caulinares y los segmentos nodales constituyen explantas adecuadas para la micropropagación de la especie.
 - Para el establecimiento de las vitroplantas se hace necesario tres etapas de cultivo: a) Iniciación de los cultivos asépticos, b) Multiplicación y alargamiento de los brotes y c) Formación de raíces en los brotes micropropagados.
- Hay diferencias marcadas en el potencial morfogénico entre las explantas provenientes de material juvenil y material adulto.
 - Es necesario la utilización de tratamientos que conduzcan a reducir la oxidación fenólica de las explantas para aumentar la supervivencia de las mismas.
 - Se requiere continuar con las investigaciones en la micropropagación del guayabo tendientes a mejorar la velocidad de crecimiento de las explantas e incrementar la tasa de multiplicación de los brotes.

Bibliografía citada

1. AMIN, M. N. y V.S. JAISWAL. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plan cell tissue organ culture*. 9:235-244.
2. AMIN, M.N. y V.S. JAISWAL. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Horticulture*. 36(1):89-95.
3. AVILÁ;N, L.; F. LEAL y D. BAUTISTA. 1989. Guayaba. En: *Manual de Fruticultura*. Editorial América. Caracas. Cap. 12:807-835.
4. BROODRIJK, M. 1989. New sterilization method for *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.). *Información Bulletin*. Citrus and Subtropical fruit research institute. No. 202:1-2.
5. CAÑIZALES, J. 1968. La guayaba y otras frutas Myrtaceas. Ed. Revolucionaria, Instituto del libro. La Habana. Cuba. 87 p.
6. DEBNATH, G.C.; S.C. MAITI. 1991. Effect of growth regulators on rooting of softwood cutting of guava (*Psidium guajava* L.) under mist. *Horticulturae Abstracts*. 61(5):4440.

7. FITCHET, M. 1989. Tissue culture of guava. Information Bulletin Citrus Subtropical fruit research Institute. 201:4-5.
8. FITCHET, M. 1992. Dimple guava established in tissue culture. Horticultural Abstracts. 62(3):2605.
9. FUSAGRI. 1989. La Fruticultura Zuliana puede ser competitiva en el exterior. Panorama. 26/02/1989. 4p.
10. HUTCHINSON J.F. y R.H. ZIMMERMAN. 1987. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. Horticultural Reviews. 9:273-37.
11. JAISWAL, V.S. y M.N. AMIN. 1986. *In vitro* shoot propagation and plantlet formation from somatic tissue of guava. VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Minneapolis. Minesota. 279p.
12. JAISWAL, V.S. y M.N. AMIN. 1987. In vitro propagation of guava from shoot culture of mature trees. Journal of Plant Physiology. 130(1):7-12.
13. KHATTAK, M.S.; M.N. MALIK y M.A. KHAN. 1992. Effect of surface sterilization agents on *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda tissue. Horticultural Abstracts. 62(1):847.
14. KILANY, O.A. y M.F. GABR. 1988. Propagation of seedless guava trees by cutting. Horticultural Abstracts. 58(8):5307.
15. LEAL, F. 1972. La Fruticultura en Venezuela durante el período 1961-1970. Revista de la Facultad de agronomía. U.C.V. Maracay. 64:37-56.
16. LITZ, R.E.; G.A. MOORE y C. SRINIVASAN. 1985. *In vitro* system for propagation and improvement of tropical fruit and palms. Horticultural Reviews. 7:157-190.
17. LOH, C.S. y A.N. RAO. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Scientia Horticultural Abstracts. 39(1):31-39.
18. MARTIN, F.W. 1984. Handbook of tropical food crops. Ed. C.R.C. Press Inc. Boca Raton. Florida. pp. 254-256.
19. MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. 15:473-497.
20. NELSON, R. 1954. Propagation of guava by graftage. Proc. Flo. St. Hort. Soc. 67:228-231.
21. PAPADATOU, P.; C.A. PONTIKIS; E. EPHTIMIADOU y M. LYDAKI. 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. Scientia Horticulturae. 45(1):99-103.
22. PEREIRA, F.M.; A.A. OIOLI y D.A. BANZATTO. 1986. Enraizamiento de diferentes tipos de estacas en folhadas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) en cámaras de nebulizao. Horticultural Abstracts. 56(1):688.
23. RATHORE, H.S.; S.M. SINGH y A.D. CHHABRA. 1977. Effect of plant regulators and their concentration on the performance of softwood cuttings of guava. Horticultura Abstracts. 47(8):7926.
24. SALUNKHE, D. K. y B. B. DESAI. 1984. Post Harvest Biotechnology of Fruits. Ed. C.R.C. Press Inc. Boca Raton. Florida. Vol. II. pp. 39-45.
25. SÁNCHEZ, L.A.; R. SALAZAR; R. TORRES y J. CHOIS. 1986. Propagación del guayabo, *Psidium guajava* L., mediante enraizado de estacas. Revista ICA. 21:8-14.
26. SKIRVIN, R.M. 1984. Fruitcrops. IN: Cloning Agricultural Plants VRa *in vitro*. Techniques. Ed. B. V. Conger. C.R.C. Press. Boca Raton. Florida. Cap. 3. pp. 51-139.

Micropropagación de guanábana (*Annona muricata* L.)*

Silvia León de Sierralta
Facultad de Agronomía
Universidad del Zulia

**Forma parte del Proyecto Aplicación del Cultivo de Tejidos en Frutales Tropicales financiado por CONDES.*

El cultivo de las Guanábana (*Annona muricata* L.) es entre los rubros frutícolas tropicales uno de los que ofrece un gran potencial como fruta exótica en los mercados subtropicales del mundo.

En Venezuela ha sido ampliamente cultivado, pero es la región Noroccidental la que presenta mayores potencialidades para su cultivo agronómico comercial.

A pesar de lo anteriormente dicho, la explotación comercial de este importante producto, se ve muy limitada por aspectos, tales como la calidad del fruto, la producción irregular y el bajo rendimiento por planta.

Estas limitaciones se deben, principalmente, al tipo de propagación, por semillas, que conlleva a una gran variabilidad genética que se manifiesta en genotipos diferentes. Este tipo de propagación (sexual) ha sido el más utilizado, debido a que la propagación vegetativa por estacas y acodos es difícil de lograr y requiere de enraizadores y técnicas de manejos especiales que elevan los costos iniciales de producción.

Con la investigación en el área de micropropagación de guanábana se pretende contribuir a la disminución de las limitaciones de pro-

ducción mediante el establecimiento de técnicas de propagación *in vitro* que permitan a los fitomejoradores la propagación masiva del material más prometedor o mejorado, para su posterior producción comercial.

Se ha señalado la regeneración *in vitro* de plántulas de *Annona muricata* L. utilizando el hipoclorito de semillas germinadas *in vitro*, las plantas obtenidas enraizaron y se transplantaron sin problema.

En *Annona squamosa* L. se ha logrado obtener organogénesis a partir de hojas provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, y a partir de callo producido cuando se cultivó el endosperma de la semilla germinada *in vitro*.

Nuestra investigación va orientada inicialmente hacia la propagación *in vitro* de clones prometedores, razón por la cual se comenzó con la utilización de material adulto como fuente de explantas.

Objetivo

El objetivo principal es el de desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de *Annona muricata* L.

Estrategias

Comparación de métodos de desinfección superficial en diferentes explantas con el fin de determinar el más efectivo en cada caso.

Evaluación de explantas y de medios nutritivos con el fin de determinar la capacidad de regeneración de éstas en la composición del medio más apropiado.

Evaluar condiciones de crecimiento más apropiadas para el cultivo *in vitro* (fotoperíodo, luz, temperatura).

Evaluar el efecto de las condiciones de crecimiento, condiciones fisiológicas, características genéticas, edad y etapa de desarrollo de las plantas donantes o madres en el establecimiento del cultivo *in vitro* de sus tejidos (incluye comparación entre material de vivero y de campo).

Desarrollar metodologías de adaptación o endurecimiento del material producido para su trasplante definitivo en condiciones de campo.

Establecer bancos de germoplasma *in vitro* que apoyen los programas de mejoramiento y que permitan el intercambio internacional.

Ensayos realizados

- Comparación de métodos de desinfección superficial en algunas explantas de *Annona muricata* L.
- Evaluación del fruto inmaduro de guanábana como explanta para inducir callogénesis.

Comparación de métodos de desinfección superficial en algunas explantas de *Annona muricata* L.

Se utilizaron tallos y pecíolos como explantas. Éstos se recolectaron de plantas adultas de guanábana, selección Sur del Lago, que se encuentran ubicadas en el Centro Frutícola del Estado Zulia.

Métodos de desinfección superficial utilizados.

Características más resaltantes:

1. Inmersión en solución preparada con Captan (3 g/l) + Rifampicina (150 mg/l) durante veinte minutos.

Lavado con Hipoclorito de sodio a 2,5% durante 10 minutos.

El tratamiento se aplicó a la mezcla de explantas.

2. Inmersión en solución preparada con Captan (3 g/l) durante 10 minutos.

Inmersión en Rifampicina (300 mg/l) durante 10 minutos.

Lavado con Hipoclorito de sodio (NaOC1) a 2,5% durante 10 minutos.

Las explantas se esterilizaron juntas.

3. Inmersión en solución preparada con Captan (3 g/l) durante 10 minutos.

Inmersión en Rifampicina (300 mg/l) durante 20 minutos.

Lavado con una de las siguientes soluciones:

T1 Hipoclorito de sodio a 5,25% durante 10 minutos

T2 Hipoclorito de sodio a 5,25% durante 20 minutos

T3 Hipoclorito de calcio a 6,0% durante 10 minutos

T4 Hipoclorito de calcio a 6,0% durante 20 minutos

T5 Cloruro mercúrico al 0,01% durante un minuto

T6 Cloruro mercúrico al 0,01% durante un minuto y luego Hipoclorito de sodio al 5,25% durante 10 minutos.

Al esterilizar se separaron los dos tipos de explantes.

4. Reducción del tamaño de la explanta

Inmersión en solución preparada con Benlate (10 g/l) durante 20 minutos.

Alcohol 70% dos minutos.

Inmersión en Gentamicina (500 mg/l) durante 20 minutos.

Utilización del antibiótico como componente del medio nutritivo.

- La esterilización superficial fue más efectiva cuando se incorporó el antibiótico al medio nutritivo después de utilizar hipoclorito de sodio en la forma convencional.
- El cloruro mercúrico fue efectivo para eliminar microorganismos pero a su vez resultó fitotóxico.
- La reducción del tamaño de la explanta favoreció la eliminación de microorganismos pero aún no se ha determinado su efecto en la capacidad regenerativa de estas explantas.

- La utilización de fungicidas y antibióticos antes de aplicar el hipoclorito disminuyó la contaminación pero no en forma total.

- Además del problema de contaminación se presentó oxidación o ennegrecimiento de los tejidos, ambos problemas han sido señalados en la literatura con mucha frecuencia cuando se trata de frutales leñosos.

Evaluación del fruto inmaduro de guanábana como explanta para inducir callogénesis.

Se utilizaron frutos inmaduros como explantas. Estos se recolectaron de plantas adultas de guanábana, selección Sur del Lago, que se encuentra ubicada en la granja Camoruco, municipio Mara, estado Zulia.

La desinfección superficial se realizó con hipoclorito de sodio a 5% durante 15 minutos.

Se utilizó el medio de Murashige y Skoog con 2,4-D como regulador de crecimiento y agua de coco.

- Tejido obtenido de los frutos inmaduros desarrolló un crecimiento tipo callo al cual actualmente se le realizan estudios histológicos.

- En este caso también se observó oxidación de los tejidos.

Al iniciar esta investigación, los problemas que han surgido son típicos en frutales leñosos, alta incidencia de contaminación y oxidación de explantas, especialmente cuando se trabaja con material de campo.

El problema de la contaminación ha disminuido y seguramente que al evaluar otros métodos podrá ser controlado en alto porcentaje, sin embargo, se considera la posibilidad de que los pretratamientos de las plantas donan-

tes contribuirán a disminuir este problema y permitirán el uso de métodos más económicos y sencillos.

El problema de la oxidación de explantas en frutales leñosos ha sido señalado en numerosas especies, tanto de origen tropical como templado. En nuestro laboratorio este problema se ha presentado en especies tales como guayabo, vid, mango y guanábana.

En la mayoría de los casos la literatura indica un control de esta oxidación utilizando pretratamiento de explantes con antioxidantes, incorporación de compuestos antioxidantes o carbón activado al medio nutritivo, modificación de las condiciones ambientales *in vitro* al iniciar los cultivos en oscuridad y/o a bajas temperaturas. Sin embargo, el éxito de estas técnicas ha sido limitado, ya que, generalmente afectan las condiciones óptimas para el crecimiento de las explantas.

Recientemente se ha enfatizado la importancia del tratamiento del material donante y el efecto del origen del mismo como medio para controlar el ennegrecimiento oxidativo y sus consecuencias en las supervivencias de las explantas al momento de establecerlas *in vitro*.

Algunos de los tratamientos, señalados en la literatura, están relacionados con la disminución de la irradiación solar bien sea con el uso de coberturas en el campo o utilizando material de vivero. Estos tratamientos se fundamentan en los procesos metabólicos inducidos por la luz, tales como la síntesis y oxidación de compuestos fenólicos.

Otros se relacionan con la selección del material óptimo lo cual involucra no solamente el tipo de explanta sino su ubicación en la planta y la etapa fenológica de la misma ya que la capacidad regenerativa parece estar controla-

da por factores endógenos, que difieren con la etapa fenológica de la planta.

En nuestro laboratorio se tienen algunas experiencias relacionadas con la aplicación de estos pretratamientos.

En el caso de guayabo se observó un aumento en la supervivencia de ápices y yemas de guayabo al iniciar su cultivo *in vitro* por efecto de la protección de la planta donante a la exposición de la luz solar. Igualmente el contenido de compuestos fenólicos preexistentes en las explantas disminuyó. Cuando se utilizaron plántulas protegidas del sol en vivero, no se presentaron problemas de oxidación.

En el caso de vid se evaluó la influencia de la etapa de desarrollo en el ennegrecimiento de las explantas al iniciarlas *in vitro*. El menor ennegrecimiento se observó en el material recolectado durante las etapas de cosecha y descanso. La exposición solar de las explantas que se recolectaron en estas etapas fue menor.

Actualmente se desarrolla un ensayo con protección solar de plantas de guanábana del cual se espera obtener menos oxidación y contaminación al iniciar el cultivo *in vitro*.

Las experiencias mencionadas fueron realizadas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, el cual se encuentra adscrito al Instituto de Investigaciones Agronómicas. El personal que ha participado en la ejecución de estas experiencias se encuentra constituido por las siguientes personas: Profesora Zenaida Viloría (Dpto. Botánica), Laboratorista Miguel Molina, Br. Yulana Fuenmayor, Br. Arlenis Albornoz, Br. Leidys Fernández, Br. Oneida Ruiz y Br. Camilo Quintero. Recientemente se incorporó el Biólogo Dionicio Romero quien ejecutará una tesis relacionada con la micropropagación de guanábana.

Control de la contaminación y oxidación fenólica en la propagación clonal *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) clon Mara-7

Lic. Mervin E. Pirela F.

Control de la contaminación

En vista de que en la propagación *in vitro* del guayabo clon Mara-7 se presentó un alto grado de contaminación, se diseñaron dos ensayos en los cuales se probaron diferentes agentes desinfectantes para lograr la esterilización superficial de las explantas.

Efecto del hipoclorito de sodio con y sin alcohol: en los tratamientos sin alcohol, el porcentaje de contaminación disminuyó de 90% a 40% a medida que aumentó el tiempo de exposición de las explantas al hipoclorito de sodio, mientras que en los tratamientos con alcohol, este porcentaje disminuyó de 70% a 60%. A su vez, el porcentaje máximo de sobrevivencia o de explantas verdes en los tratamientos sin alcohol fue de 60% mientras que en los tratamientos con alcohol fue de 20%. Estas cifras corresponden en ambos casos a los tratamientos de 15 min.

El uso del alcohol a 70% por 5 min. tal como fue empleado por Loh y Rao (1989) estimuló la oxidación de las plantas, dando como resultado un menor número de explantas verdes en dichos tratamientos. Este resultado es contrario al obtenido por estos investigadores, ya que ellos no señalan haber tenido problemas de oxidación fenólica usando este

agente desinfectante. El tratamiento con hipoclorito de sodio a 5%, por 15 min. sin alcohol se seleccionó como método de desinfección en experimentos sucesivos.

Efecto del nitrato de plata: el porcentaje de contaminación en los diferentes tratamientos fue de 10 a 20% mostrándose la clara eficiencia del nitrato de plata como agente desinfectante. Sin embargo, el porcentaje de explantas verdes se redujo de 90% a 40% a medida que se aumentó el tiempo de exposición de las explantas a dicho agente.

Se registró un moderado porcentaje de oxidación que se incrementó de manera directamente proporcional al tiempo de exposición pasando de 0% a los 5 min. hasta 50% a los 20 min. El tratamiento por 5 min. se consideró el mejor, con 90% de explantas verdes, 10% de contaminación y 0% de oxidación. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Broodrijk (1989) en cuanto al control de la contaminación, pero son contradictorios en cuanto al porcentaje de oxidación fenólica; siendo en este ensayo de 30% a los 15 min. mientras que este investigador señala un grado de oxidación mínimo con el mismo tiempo de exposición. Se observó un quemado en las hojas más externas y un retardo en el desarrollo de las explantas.

Control de la oxidación fenólica

Debido a que las explantas del guayabo se oxidan y necrosan rápidamente, se diseñó un ensayo para su control:

Efecto del ácido cítrico y ácido ascórbico: el uso de la solución antioxidante de ácido cítrico; ácido ascórbico de 75:50 mg/l, respectivamente, redujo el porcentaje de oxidación fenólica, siendo de 10 a 20% en los tratamientos donde se usó la solución y de 40 a 50% en los tratamientos control. La respuesta fue análoga tanto para explantas procedentes de material adulto como para los porcentajes de injerto. Debido a su eficiencia en controlar la oxidación fenólica, esta solución se empleó en ensayos sucesivos. Estos resultados concuerdan con los autores, quienes usan de manera rutinaria esta solución, ya que reduce el grado de oxidación de explantas (Amin y Jaiswal 1987, 1988; Jaiswal y Amin 1986, 1987; Fitchet-Purnell, 1990).

Bibliografía

AMIN, M.N. y V. S. JAISWAL. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Horticulturae*. 36(1):89-95.

AMIN, M.N. y V. S. JAISWAL. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in*

vitro shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant cell tissue organ culture*. 9:235-244.

BROODRIJK, M. 1989. New sterilization method for *in vitro* culture of guava (*Psidium guajava* L.). *Information Bulletin, Citrus and Subtropical fruit Research Institute*. No. 202:1-2.

FITCHET, M. 1989. tissue culture of guava. *Information Bulletin Citrus and Subtropical fruit Research Institute*. No. 201:4-5.

JAISWAL, V.S. y M.N. AMIN. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture of mature trees?. *Journal of plant Physiology*. 130(1):7-12.

JAISWAL, V.S. y M.N. AMIN. 1986. *In vitro* shoot Propagation and plantlet formation from somatic tissue of guava. VI International Congress of plant tissue and cell culture. Minneapolis, Minnesota. pp. 279.

LOH, C.S. y A.N. RAO. 1989. Clonal Propagation of guava (*Psidium guajava* L.). from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 39(1):31-39.

Aislamiento y purificación de protoplastos de *Persea* spp.

Ana M. Liendo A.
Ing. Agr. M Sc.

A nivel mundial, en Venezuela una de las principales limitantes que frenan el desarrollo del cultivo del aguacate *Persea americana* Mill es la enfermedad de la pudrición de las raicillas causadas por el hongo *Phytophthora cinnamoni* Rands, debido a que no solo reduce los rendimientos sino que acorta drásticamente la duración de las plantas.

Por esta razón se planteó la realización de la propagación masiva de cultivares resistentes al hongo, en especial el cultivar Duke, que se encuentra en el país en cantidad limitada y otra especie de género *P. caerulea* (R & P) Mez que se encuentra ampliamente distribuido en Venezuela, pero es incompatible con el Aguacate.

Así mismo, se realizaron pruebas de aislamiento y purificación de protoplastos, como fase inicial en la incorporación de resistencia a cultivares susceptibles. Para esto se utilizaron hojas de aguacatillo y de aguacate criollo provenientes de plantas en cámara de crecimiento y hojas de aguacatillo provenientes de plantas cultivadas *in vitro*.

La digestión enzimática se realizó empleando la solución de enzimas de digestión utilizadas para obtener protoplastos de yuca a par-

tir del mesofilo foliar, modificando la concentración de enzimas de digestión y las concentraciones de manitol a fin de determinar las concentraciones óptimas para el aguacate.

Las concentraciones enzimáticas utilizadas fueron las siguientes: celulasa/macerasa(%)= 0,5/0,2; 1/0,2; 1/1; 2/2, 3/0; 3/0,3; 3/3.

En cuanto a las concentraciones de manitol, éstas fueron de 0,45; 0,5; 0,6 y 0,7 M.

El procedimiento secuencial empleado en las fases de digestión y purificación fue similar al realizado en la obtención de protoplastos de yuca.

Para el conteo de los protoplastos se utilizó la cámara de Neubauer; la viabilidad se determinó por la técnica de fluorescencia con diacetato de fluoresceína con calcofluor, de la celulasa que compone la pared celular, Nagata y Colb, 1970.

En general se obtuvo un número suficiente de protoplastos viables por el orden de 10^5 prot/ml como para realizar la técnica de fusión; con una relación enzimática de celulasa 1% a macerasa 0,2% con 4h de digestión y una osmolaridad de 0,6 M de manitol.

Bibliografía

CORPORACIÓN ANDINA DE FOMENTO.

1988. Tópicos de ingeniería genética y regeneración de plantas. Editado por L. Villegas. Instituto Internacional de Estudios Avanzados. Caracas, Contemporáneo. p. 67-80; 126-131.

CORPORACIÓN ANDINA DE FOMENTO.

1989. Manipulación genética de protoplastos. Editado por L. Villegas. Instituto Internacional de Estudios Avanzados. Caracas. Contemporáneo. 220p.

RONDÓN, A.; SUÁREZ, Z.; FIGUEROA, M.; SOLORZANO, R. Ó.; TELLECHEA, V.

1988. Comportamiento de los patotipos de *Phytophthora cinnamoni* aislados de aguacate en Venezuela. Fitopatología Venezolana. 1(1):14-16.

SANTANA, M. 1989. Obtención y caracterización de una población de protoplastos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) Homogénea en cuanto a la carga de superficie de sus membranas. Trabajo especial de Grado. Universidad Simón Bolívar. Venezuela. 77p.

ZENTMEYER, M. 1980. *Phytophthora cinnamoni* and the Diseases it causes. Monograph 10. The Amer. Phytop. Soc. 96p.

Avances en la micropropagación de banano y plátano en Ecuador

Fatima Macias

Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censo.

Informe 1992.

Ecuador, por su ubicación geográfica, tiene una gran diversidad de suelos y climas que hace posible cultivar distintas especies vegetales exóticas, y también es centro de origen de muchas especies de enorme valor genético, potencialmente aprovechables.

El banano y el plátano son frutas tropicales de gran aceptación en los mercados internacionales, constituyen una importante fuente alimenticia en los países productores y consumidores. Su producción contribuye a la captación de divisas para el país y a la generación de empleo.

En Ecuador existen 186 160 ha sembradas de banano. De esta superficie 143 500 son cosechadas, con un rendimiento promedio de 21,59 t/ha. En el caso del plátano existen 102 280 ha sembradas con un rendimiento promedio de 10,16 t/ha (Instituto Ecuatoriano de Estadística y Censo, 1992).

Ecuador tiene una participación de 26% de la exportación mundial del banano, que lo consolida como uno de los primeros productores en el mundo. La exportación de esta fruta representa alrededor de 715,9 millones de dólares al año. En cambio el plátano, si bien se exporta en menor cantidad, está libre entre los principales alimentos básicos para los ecuatorianos.

Uno de los graves problemas que afecta a la producción de estos cultivos, es la presencia de la enfermedad foliar conocida como Sigatoka negra, (*Micosphaerella fijiensis* Morelet), que se identificó por primera vez en Ecuador en 1987. Desde entonces se ha diseminado por todas las zonas bananeras y plataneras del país. Se ha llegado a estimar que esta enfermedad puede reducir hasta 70% de la producción. En el caso del plátano la susceptibilidad de las variedades, los costos elevados que demanda su control y el tamaño de sus explotaciones, no permiten hacerle frente a este problema de una manera eficaz.

Ante esta circunstancia, el INIBAP esta llevando un experimento con el propósito de evaluar el comportamiento agronómico y la susceptibilidad de híbridos de banano y plátano a la mencionada enfermedad, procedente de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). Hasta la fecha se han seleccionado algunos materiales por sus características agronómicas, de producción y resistencia.

En Ecuador el cultivo de tejidos se ha aplicado a muchos frutales, especialmente andinos, resaltando en la costa la multiplicación masiva de banano y plátano como frutas tropicales. El potencial de micropropagación es muy grande especialmente para multiplicar mate-

riales sobresalientes de banano y plátano, razón por la que existe gran interés por parte de algunas empresas exportadoras para desarrollar sistemas de producción masiva de plantas de buena calidad, alta producción y libres de problemas fitosanitarios, especialmente de naturaleza viral.

En la EET-Pichilingue del INIAP, se han iniciado trabajos en cultivo *in vitro*, aprovechando las técnicas desarrolladas por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE, Costa Rica) y la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA, Honduras) donde se han obtenido logros significativos en micropropagación de banano y plátano.

En la EET-Pichilingue, los objetivos del laboratorio de cultivo de tejidos, básicamente son los siguientes:

- Multiplicar y adaptar materiales de banano y plátano con características de resistencia a Sigatoka negra, ~~{Mycosphaerella fijiensis, Morelet}~~, procedentes de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA).
- Contribuir con los Programas de mejoramiento genético de banano y plátano en Ecuador.

La metodología de trabajo en el laboratorio de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, para el cultivo de ápices *in vitro* consta de los pasos siguientes:

Seleccionan hijuelos en el campo, que presenten buenas características productivas y

sanitarias, de una altura entre 50 y 70 cm. Este material es sometido a un proceso de desinfección mediante el uso de cloro comercial a 20% durante 20 minutos. Luego en condiciones asépticas (cámara de flujo laminar) se eliminan las hojas hasta obtener los ápices de los colinos.

Los ápices se cultivan posteriormente en un medio básico de Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas, bencil-aminopurina, sacarosa y agar.

Para el crecimiento y desarrollo, los explantes se incuban bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y humedad relativa. Una vez que se desarrollan los brotes, se procede a la multiplicación de los mismos, con la finalidad de incrementar el número de plántulas o a colocar en un medio de enraizamiento.

Las plántulas *in vitro*, cuando presentan 4-5 hojas se pasan a condiciones de invernadero para su aclimatación. En este proceso las plántulas requieren de un ambiente con alta humedad relativa durante las dos primeras semanas, la misma que se reduce en forma gradual.

Al momento del trasplante, las plántulas se colocan en recipientes que contienen un sustrato esterilizado compuesto de suelo y arena en una proporción de 3:1, respectivamente. Posteriormente, las plántulas pasan a fundas de polietileno conteniendo sustrato de tierra de montaña cernida hasta su trasplante definitivo en el campo, cuando muestren un desarrollo adecuado.

Estado actual de la micropropagación de frutales en Ecuador

Laura Muñoz E.

*Técnico Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos
Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
Casilla 17-01-340. Quito. Ecuador.*

Ecuador es privilegiado por poseer una gran variabilidad genética tanto de tubérculos, raíces, frutales, especies madereras, medicinales y textiles, con una amplia adaptación a diversos agroecosistemas. Igualmente tiene numerosos zonas ecológicas propicias para el cultivo de las diferentes especies de frutales.

En el Cuadro 1, se presenta una lista de los principales frutales cultivados en el país, con la superficie sembrada, producción y rendimiento. Estos frutales ocupan unas 273 680 ha aproximadamente, de las cuales 206 950 ha corresponden al cultivo de banano (*Musa sp.*) solamente 62 940 ha comprenden el resto de frutales, de las cuales la naranjilla (*Solanum quitoense*) ocupa alrededor de 10 780 ha, seguida de naranja con 10 350 ha. Cabe indicar que en el Cuadro 1 no se incluyen un gran número de especies frutícolas, como la pasifloras ya que el área sembrada es muy pequeña y generalmente se encuentran a nivel del pequeño agricultor.

En la actualidad existe una gran demanda por parte de los fruticultores en adquirir plantas de frutales libres de patógenos, especialmente libres de virus, de ahí la importancia para la producción de portainjertos sanos y resistentes

a enfermedades. Uno de los métodos para la obtención de material sano es aplicando la técnica de cultivo de tejidos, por medio del cultivo de meristemas combinado con la termoterapia (Hernández, 1992).

En Ecuador, existen algunos laboratorios que realizan cultivo de tejidos con fines de investigación y también de producción de plantas; existen laboratorios con 2 a 18 años de funcionamiento. A continuación se nominarán los principales laboratorios que realizan cultivo de tejidos.

Laboratorio de cultivo de tejidos "Oscar S. Malamud" de INIAP

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos se encuentra en funcionamiento desde aproximadamente 14 años. A partir de su formación se dedica a la producción de semilla prebásica de papa de las variedades generadas por el INIAP y liberadas de virus por el Centro Internacional de la Papa (CIP).

En 1986, se iniciaron en este Laboratorio los trabajos de cultivo de tejidos con otros tubérculos andinos, se probaron diferentes protocolos para las fases de introducción, micropro-

Cuadro 1. Área sembrada, producción t y rendimiento t/ha frutales

Especie (Fruta Fresca)	Área sembrada miles ha	Producción t (1000 kg)	Rendimiento t/ha
Babaco (<i>Carica pentagona</i>)	0,12	706,82	10,79
Capulí (<i>Prunus capuli</i>)		2,40	0,83
Claudia (<i>Prunus ceracifera</i>)	1,44	4 849,69	3,43
Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>)	0,96	667,21	1,38
Durazno (<i>Prunus persica</i>)	2,12	8 872,51	5,62
Frutilla (<i>Fragaria</i> sp.)	0,08	2 190,00	30,00
Guaba (<i>Inga edulis</i>)	0,38	602,06	3,37
Guayaba (<i>Psidium guajaba</i>)	0,08	299,62	3,19
Lima (<i>Citrus aurantifolia</i>)	0,05	812,71	5,72
Limón (<i>Citrus limon</i>)	3,05	8 742,52	4,79
Mandarina (<i>Citrus reticulata</i>)	3,11	20 581,83	7,29
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	3,18	5 117,77	9,67
Manzana (<i>Malus domestica</i>)	4,25	23 364,76	6,20
Mora (<i>Malus domestica</i>)	1,80	2 110,58	1,41
Naranjilla (<i>Solanum guitoense</i>)	10,78	39 365,55	4,53
Níspero (<i>Eriobotoya japonica</i>)		8,34	1,22
Pera (<i>Pyrus comunis</i>)	2,21	15 091,08	7,53
Tomate de árbol (<i>Cyphomandra betacea</i>)	2,51	18 302,03	11,75
Toronja (<i>Citrus decumana</i>)	0,35	1 992,52	7,03
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)		128,42	4,06
Banano (<i>Musa</i> sp.)	206,95	3 994 641,49	21,59
Naranja (<i>Citrus cinnensis</i>)	0,35	76 183,23	7,69
Cocotero (<i>Cocos nucifera</i>)		31 542,79	9,84
Ciruelo (<i>Bunchosia armeniaca</i>)	2,04	7 845,76	4,14
Melón (<i>Cocumis melo</i>)	3,47	34 614,07	10,19
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	1,78	16 211,34	12,19
Piña (<i>Ananas comosus</i>)	5,05	43 270,95	12,54
Sandía (<i>Citrullus vulgaris</i>)	3,78	40 349,36	12,12
Tamarindo (<i>Uribea tamarindoides</i>)		157,81	5,07
Total área sembrada	273,68	4 398 635,10	225,18

Fuente: Instituto de Estadística y Censo (INEC), 1992

pagación y conservación *in vitro* de oca (*Oxalis tuberosa*), melloco (*Ullucus tuberosus*) y mashua (*Thopaeolum tuberosum*).

En la actualidad INIAP dispone aproximadamente de 10 protocolos de uso rutinario para el cultivo *in vitro* de diversas especies, así por ejemplo: jícama (*Polymnia sochifolia*) quishuar (*Buddleia incana*) miso (*Mirabilis expansa*) banano (*Musa sp.*) jíquima (*Pachyhzus sp.*) zanahoria blanca (*Arracacia xanthorhiza*) De ese modo se ha logrado consolidar duplicados en laboratorio de especies varias y de uso de fitomejoramiento que suman un total aproximado de 1 007 entradas (Cuadro 2).

Por razones de estrategia y seguridad del germoplasma, se conserva un duplicado parcial de la Colección Mundial de Papa del CIP, con un total aproximado de 3 690 clones, bajo un acuerdo de cooperación INIAP-CIP.

El objetivo de conservar este germoplasma, es evitar en parte los procesos de erosión genética y facilitar el uso de este material entre los fitomejoradores de los centros internacionales y nacionales.

Aparte de estos trabajos en raíces y tubérculos andinos se ha introducido *in vitro* especies forestales como: quishuar (*Buddleia incana*), cedro (*Cedrella montana*) y pumamaqui (*Oreophanax ecuadorensis*), la especie que presentó resultados exitosos en el cultivo *in vitro* fue el quishuar. Además se micropropaga una especie ornamental violeta africana. En cuanto a frutales, se mantiene *in vitro* una accesión de pepino dulce (*Solanum muricatum*), en pitajaya (*Hylocereus sp.*) se realizó algunas pruebas de germinación de semilla sexual *in vitro*, también se realizó micropropagación en frutilla y liliáceas.

Laboratorio de cultivo de tejidos, INEXA (Industria Extractora C.A.) Quito

Fue el primer laboratorio del país, tiene aproximadamente 18 años de formación, se dedica a la introducción, micropropagación y conservación de piretro, *Datura*, entre otras especies importantes para la extracción de alcaloides. Además el laboratorio presta servicios a empresas o agricultores que lo necesiten y es así como se encuentran trabajando con jengibre, abacá (*Musa textilis*) tres variedades de plátano (*Musa sp.*) con resistencia a Sigatoka negra, material proveniente de CATIE, Costa Rica.

Este laboratorio ha multiplicado *in vitro* frutilla (*Fragaria sp.*) dos variedades de piña (*Anana comosus*) y actualmente están por iniciar su Banco de Germoplasma de achiote (*Bixa orellana*) con fines de extracción de colorante.

Laboratorio de cultivo de ejidos de la Universidad Central del Ecuador, Quito

El laboratorio inició sus actividades hace aproximadamente seis años, en los cuales han desarrollado algunos protocolos para la introducción y establecimiento *in vitro* de frutales, entre éstos; pepino dulce (*Solanum muricatum*), mora (*Rubus glaucus*), banano (*Musa sp.*), frutilla (*Fragaria sp.*), taxo (*Passiflora mollissima*), granadilla (*Passiflora ligularis*), uvilla (*Physalis peruviana*), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) que al momento estudian con fines de mejoramiento a partir de cultivo de protoplastos.

Además han realizado germinación semilla sexual de orquídeas, y de otras plantas ornamentales.

Cuadro 2. Entradas del Banco de Germoplasma de INIAP conservadas *in vitro* (hasta agosto de 1994).

Especie/Origen	Método de conservación <i>in vitro</i>	Número de entrada
Papa: germoplasma complementario a la Colección Mundial del CIP	Manitol 4%, 6± 1°C	405
Papa: Colección Ecuatoriana (CEP); custodia del Programa de Papa-FORTIPAPA	Micropropagación Manitol 4%, 6± 1°C	350
Papa: clones resistentes a heladas (<u>anti-freezing</u>) entregados por la CAF	Micropropagación Manitol 4%, 6± °C	30
Papa: clones para agroindustria; Programa de Papa-FORTIPAPA	Micropropagación Manitol 4%, 6± 1°C	20
Papa: especies silvestres, recolecciones 1) DENAREF	Micropropagación Manitol 4%, 6± 1°C	24
Papa: materiales libres de virus	Micropropagación Manitol 4%, 6± 1°C	13
Jímaca: duplicado colección nacional	Sales MS, 19°C	27
Miso: duplicado colección nacional	Sales MS, 19°C	10
Camote: germoplasma de otras estaciones INIAP	Sales MS, 19°C	33
Mellico: colección satélite 2) del DENAREF	Introducción Mitad MS, 6+ 1°C	90
Banano: germoplasma de ensayos preliminares	Sales MS, 19°C	1
Ornamentales: ensayos preliminares	Sales MS, 19°C	1
Quishuar: germoplasma de forestales	Sales MS, 19°C	1
Pepino dulce: ensayos de cultivo <i>in vitro</i>	Sales MS, 19°C	1
Pitajaya: ensayos preliminares de inducción a germinación en semillas y micropropagación	Sales MS, 19°C	1
Total		1 007

1) Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos

2) Sin ser una colección nuclear (core-collection) contiene los morfotipos más representativos de todo el germoplasma disponible.

La mayor parte de estas investigaciones se han efectuado a través de la modalidad de tesis de grado, previo a la obtención de título de Ingenieros Agrónomos, con la participación de egresados-becarios y la respectiva capacitación en las técnicas de cultivo de tejidos.

Por lo general, la temática de las investigaciones *in vitro* se enmarca en una planificación de prioridades del ISIA (Instituto Superior de Investigaciones Agropecuarias) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador.

Laboratorio de la Corporación Ambiente y Desarrollo, AMDE, Ambato

Institución privada, sin fines de lucro, se dedica a la aplicación de la biotecnología para el rescate de especies nativas promisorias en peligro de extinción.

En la actualidad trabajan con un Proyecto conjunto con el CONUEP-UTA (Consejo Nacional de Universidades y Escuelas Politécnicas-Universidad Técnica de Ambato) (1993-96) con la finalidad de aplicar protocolos de multiplicación *in vitro* de especies de hoja caduca.

Los frutales con los que están trabajando son: manzana (*Malus comunis*) portainjertos Franco, MM-109, además de las variedades *Emilia*, *Golden Delicious*; en durazno (*Prunus persica*) las variedades *Conservero Amarillo*, *Guaytambo*; pero (*Pyrus comunis*), mora de castilla, mora silvestre y cuatro variedades de mora americanas, naranjilla (*Solanum quitoense*) y tomate de árbol.

Además frambuesa (*Rubus* sp.), cherry-capullí (*Prunus capuli*) (F1 cruza de cereza enano con capulí) proveniente de Carolina del Norte, USA.

También realizan trabajos con jigacho (*Carica* sp.) y chamburo (*Caripa* sp.) Además la evaluación de babaco (*Carica pentagona*) en cuanto a resistencia de nematodos.

Otras actividades son identificación, eliminación de virus en zanahoria blanca y mashua para propagación de semilla certificada.

Laboratorio de cultivo de tejidos LABOPLANT, Quito

Laboratorio privado de reciente formación, cuenta con dos años de trabajo y se dedica a la producción de plantas ornamentales mediante la técnica de cultivo de tejidos. Al momento hacen micropropagados de frutilla (*Fragaria* sp.) fresa (*Fragaria* sp.) orquídeas.

En su planificación a futuro realizará protocolos para la multiplicación *in vitro* de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) babaco (*Carica pentagona*) y especies forestales.

Laboratorio de cultivo de tejidos MAOSCAP S.A., Cuenca

Ubicado al sur del país, en la ciudad de Cuenca, único laboratorio de cultivo de tejidos en esa región, su actividad se enfoca exclusivamente a la multiplicación de flores de reproducción asexual.

El laboratorio cuenta con una infraestructura sofisticada de avanzada tecnología y por lo tanto de un costo muy elevado. Laboran con financiamiento propio de los accionistas de la empresa, la misma tiene apenas cuatro años de funcionamiento.

Las especies que multiplican son: rosas, gérberas (*Gerbera aurantiaca*) gypsophila (*Gypsophila paniculata*) y astromelias, con un mercado externo seguro que demanda de

unas 200 000 plantas por mes, pero el laboratorio puede atender pedidos de 20 000 a 50 000 plantas mensuales y posee una capacidad de producción inicial de 1 000 000 de plantas por año.

La empresa garantiza la calidad sanitaria del material vegetal, por ser plantas libres de enfermedades especialmente de virus.

Laboratorio de cultivo de tejidos VITRO del Ecuador, Guayaquil

El laboratorio pertenece a la empresa privada y se sitúa en la costa ecuatoriana, en la ciudad de Guayaquil, se especializa en la producción *in vitro* de plantas tropicales.

Es un laboratorio privado con financiamiento propio, proveniente de los recursos de las ventas del material vegetal y también del aporte de las empresas del grupo.

Sus actividades están en la micropropagación de banano de las variedades más comerciales a nivel mundial como son: *Giant cavendish*, *Gran nine* y *Williams*; además producen plantas de piña de tipo de exportación.

La empresa realiza proyectos con Colombia y Estados Unidos, también entrega plantas a diferentes empresas a nivel nacional.

El laboratorio tiene una capacidad de producción anual de 3 000 000 plantas *in vitro*; la venta de las plantas se realiza luego de dos fases de aclimatación en vivero, cuando los materiales tienen aproximadamente 50 cm de altura.

Conclusiones

Ecuador junto con otros países del Área Andina, forma parte de los centros de origen y dis-

persión de numerosas especies cultivadas. Como se observa en el Cuadro 2, existe una gran cantidad de especies frutales que se cultivan a nivel de todo el país, tanto materiales introducidos como nativos, cabe indicar que las especies nativas todavía no están tomadas en cuenta y se encuentran en el grupo de las especies en peligro de extinción.

La técnica de cultivo de tejidos es una herramienta utilizada desde hace algunos años para el rescate de los materiales en vías de erosión genética, como es el caso de las colecciones de tubérculos y raíces andinas, la cual se mantienen a largo plazo por medio de la conservación *in vitro*.

En el país, la aplicación de la micropropagación de frutales es muy reciente, encontrándose en la fase de investigación. En el futuro se podrán comparar los rendimientos entre frutales que provengan de cultivo *in vitro* frente a los materiales multiplicados de forma tradicional.

Existen frutales que tienen importancia económica en el país, es el caso de los cítricos, como se ha visto ningún laboratorio realiza el cultivo *in vitro* en esta especie (Cuadro 3) siendo una actividad prioritaria ya que es un cultivo que tiene problemas por la calidad de los portainjertos y la presencia de enfermedades viróticas.

Bibliografía

CONACYT, 1993. Ecuador: Ciencia y Biotecnología. Biotecnología Clave para Desarrollo. Quito, Ecuador. 4(14): 38p.

HERNÁNDEZ, R. 1992. Obtención de plantas libres de virus. En: Técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas Santa Clara, Instituto de Biotecnología de las Plantas UCLV. Cuba. p. 1-5.

INEC, 1992. Sistema Estadístico Agropecuario Nacional, Encuesta de superficie y producción agropecuaria por muestreo de áreas. Quito, Ecuador. p. 77-78.

ORTEGA, A. 1991. Manejo y conservación de los Recursos Fitogenéticos en Frutales Nativos. En: Técnicas para el manejo y uso de Recursos Genéticos Vegetales. DENAREF, INIAP, Quito, Ecuador. Editorial Porvenir. p. 64-70.

Cuadro 3. Principales laboratorios con área de estudio en cultivo de tejidos y especies en estudio (hasta agosto de 1994).

Nombre laboratorio	Ubicación	Especies frutales
INIAP	Quito	Pepino dulce, pitajaya
INEXA	Quito	Frutilla, plátano, piña
Universidad Central	Quito	Pepino dulce, mora, banano, frutilla, taxo, granadilla, uvilla, tomate de árbol.
AMDE	Ambato	Manzana, durazno, pero, mora, naranjilla, tomate de árbol, babaco, frambuesa, jigacho, chamburo
Laboplant	Quito	Banano, plátano, frutilla, mora de castilla en promoción
Bioveget	Quito	Fresa, frutilla
Vitro del Ecuador	Guayaquil	Banano, variedades comerciales

Fuente: Ecuador Ciencia y Tecnología CONACYT (actualmente FUNDACYT) 1993, p. 18-22.

Aplicación de la biotecnología al cultivo del mango (*Mangifera indica* L.)

Efraín G. Salazar

FONAIAP - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
Instituto de Investigaciones Agronómicas.

Generalidades

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los rubros frutales tropicales de mayor importancia económica. Su demanda es alta, no sólo para el consumo como fruta fresca, sino como materia prima para la industria, donde es procesado para la fabricación de jugos, conservas, confitería, otros. En algunos países como India, las semillas secas se usan para el consumo humano. Igualmente, es una especie rica en compuestos producto del metabolismo secundario, algunos de los cuales pueden ser tóxicos para el hombre o para los animales. Las hojas son usadas en la alimentación del ganado, pero su uso en altas cantidades ha producido efectos nocivos en los animales, probablemente debido a las cantidades altas de compuestos como la trementina. Del mismo modo, es un árbol bastante utilizado como especie ornamental en plazas y jardines, lo realza aún más la importancia del cultivo.

La demanda de mango, por parte del mercado internacional, ha ido en aumento, lo cual lo convierte en una posible fuente alternativa de divisas, impulsando de esta manera la economía agrícola del país. En este sentido, es de hacer notar la ventaja competitiva de Venezuela sobre otros países exportadores de mango, sobre la base de una producción temprana de

frutos de la variedad 'Haden', los cuales están listos para ser colocados en el mercado internacional entre los meses de abril y mayo, cuando el grueso de la producción mundial de mango todavía no está lista para las exigencias de este mercado.

Sin embargo, a fin de aprovechar la ventaja competitiva de la producción temprana de estas variedades, los frutos deben cumplir con los requerimientos de calidad vigentes en el mercado internacional. En este sentido, la incidencia de enfermedades, principalmente bacterianas y fungosas, disminuyen la posibilidad de colocar los frutos venezolanos en el mercado internacional, siendo necesaria la obtención de materiales tolerantes o resistentes a las principales plagas y enfermedades que afectan el rendimiento y calidad de los frutos del mango, entre las cuales se pueden mencionar bacterias del género *Erwinia* y *Pseudomonas*, así como hongos de los géneros *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Botriodiplodia*.

El mejoramiento genético convencional en el mango se hace dificultoso, debido a su biología floral. Hay una superproducción de flores y por ende una alta eliminación, siendo laborioso y poco recomendable el marcaje de las mismas, con fines de polinización, debido a la escasa posibilidad de permanencia de las flo-

res en el árbol, ya que no se conoce la dinámica de eliminación de éstas por parte de la planta.

Adicionalmente, el porcentaje de polinización de las flores es relativamente bajo y se estima que hasta un máximo de 1% de las flores producidas, en condiciones favorables, logran ser polinizadas y posteriormente fecundadas, lo cual complica un poco más el panorama para la implantación de programas de mejoramiento genético basados en estrategias tradicionales.

Finalmente, es necesario agregar, que para las enfermedades mencionadas no se han identificado fuentes naturales de resistencia o tolerancia en plantas de mango, ni en individuos filogenéticamente cercanos a ellas. La ausencia de plantas que exhiban las características agronómicas deseadas, hace aún más difícil el uso de cruzamientos sexuales para obtener las plantas agronómicamente mejoradas.

Ante esta situación, la biotecnología se presenta como una de las alternativas viables para la producción de plantas de mango mejoradas genéticamente, ya que permite la polinización y fecundación artificial de óvulos, el recate de embriones cigóticos, la propagación masiva de plantas genéticamente uniformes, así como la introducción de genes provenientes de especies filogenéticamente distantes de las plantas de mango, como es el caso de bacterias, hongos, virus y/o animales.

Experiencias biotecnológicas en el cultivo del mango

Para la aplicación de cualquiera de las técnicas biotecnológicas existentes, es necesario contar con un protocolo de regeneración *in vitro* de plantas. Sin embargo, son pocos los trabajos señalados para el cultivo del mango,

probablemente debido a ser un cultivo tropical, perenne y rico en compuestos secundarios que pueden fácilmente obstaculizar el desarrollo *in vitro* de los tejidos.

Los primeros señalamientos de la aplicación del cultivo *in vitro* de tejidos de mango se remontan a los trabajos de Litz (1984a y 1984b) con la inducción de callos a partir del cultivo *in vitro* de tejidos nucelares, experiencias realizadas en mangos monoembriónicos y poliembriónicos. Posteriormente, DeWall *et al.*, (1989) logran la inducción de embriogénesis somática a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros, abriendo la posibilidad de rescatar *in vitro*, embriones cigóticos de mango, desde los primeros estadios de desarrollo. Java *et al.*, (1994) indican la rápida inducción de embriogénesis somática a partir de callos de origen nucelar.

Las técnicas del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros se afinaron para las variedades de mango pertenecientes a la colección de variedades del CENIAP (Salazar *et al.*, 1993) obteniéndose la producción masiva de embriones somáticos y la regeneración de brotes foliados de mango, con apariencia coriácea y baja supervivencia al trasplante a suelo.

Con relación a los trabajos de ingeniería genética y/o caracterización molecular, se tiene que Litz *et al.*, (1988) establecieron la metodología para transferir genes a embriones somáticos de mango, mediante el uso de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, observando la expresión transiente del gen GUS, y la formación de embriones somáticos en medio con kanamicina. En cuanto a la resistencia a este antibiótico, Matthews y Litz (1990) establecieron que la respuesta de los tejidos de mango a la kanamicina era dependiente del genotipo, pero que se observaban daños o alteraciones en el desarrollo de los embriones en medios con más de 40 µg/l del antibiótico.

Finalmente, Degani *et al.*, (1990) caracterizaron variedades de mango mediante los polimorfismos observados en 13 sistemas de isoenzimas estudiados en geles de poliacrilamida.

Aplicación de la biotecnología al cultivo del mango en el CENIAP

En el Departamento de Biotecnología del CENIAP, desde 1991, se han venido desarrollando varias líneas de investigación relacionadas con el cultivo del mango. En este sentido, se ha intentado desarrollar protocolos de regeneración de plantas de mango a través del cultivo de meristemas apicales, en lugar de los sistemas establecidos por Litz (1984a y 1984b) basados en el cultivo *in vitro* de tejido nucelar. Los tejidos meristemáticos, además de permitir la regeneración de plantas a través de organogénesis directa, permiten asociar la limpieza fitosanitaria de los materiales a las ventajas de la propagación asexual. Por otro lado, la regeneración de plantas a partir de tejido nucelar ha presentado problemas de reversión a la juvenilidad en otras especies de frutales leñosos, como es el caso de los cítricos. En este sentido, para evitar este tipo de problemas en las plantas de mango regeneradas, se planteó el uso de meristemas apicales como explante inicial en las experiencias de regeneración de plantas. Hasta la fecha se ha logrado el establecimiento *in vitro* de ápices caulinares, mediante el cultivo en medio MS con los macroelementos diluidos a un octavo de la concentración inicial. Esto evitó el necrosamiento de los tejidos, así como a la aparición de exudados marrones alrededor del tejido.

En vista de la necesidad de extraer los meristemas, a partir de plantas creciendo en condiciones de campo, se determinó que la estrategia de desinfección más eficiente, involucraba la colocación de los ápices caulinares bajo agua

de chorro por un mínimo de seis horas, preferiblemente toda la noche, y el lavado con hipoclorito de sodio 50% de una solución comercial durante 30 min. La aparición de bacterias se redujo al agregar la medio sulfato de gentamicina (250 mg/l) esterilizado por filtración.

Los meristemas caulinares lograron desarrollar hasta cuatro primordios foliares; sin embargo, el crecimiento fue lento, y finalmente los ápices se necrosaron independientemente del uso de soluciones o tratamientos antioxidantes.

Se realizaron experiencias para el cultivo de microestacas o segmentos nodales (hasta dos nudos) obteniéndose un rápido necrosamiento de los tejidos y la aparición de bacterias y hongos, posiblemente debido a la mayor cantidad de tejido involucrado en el cultivo *in vitro* de este tipo de explante.

Se validó la metodología de Litz (1984a) para la inducción de embriogénesis somática, a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros. Se determinó que los embriones cigóticos debían provenir de frutos inmaduros de un centímetro de longitud y cultivados en medio de Litz suplementado con 2,4-D y BA, ambos en concentración de un miligramo por litro. Los embriones somáticos se produjeron en medio con 10% de agua de coco y la maduración de los embriones siguió un proceso normal hasta la fase cotiledonar. Se produjeron brotes coriáceos, los cuales enraizaron en medios desprovistos de reguladores de desarrollo. Las plantitas producidas no soportaron el trasplante a condiciones de suelo.

De igual modo, se ha calibrado la metodología para el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas, lográndose la formación de masas celulares, principalmente en los bordes de las hojas, donde el mesófilo está en contacto directo con el medio de cultivo, el cual contenía las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con 3 mg/l de 2,4-D como fuente

auxínica. El oscurecimiento de los tejidos fue el principal factor que imposibilitó la regeneración de cualquier tipo de estructuras.

Paralelamente a la investigación, ya mencionada, se realiza la caracterización de germoplasma de los materiales pertenecientes a la colección de variedades del CENIAP, mediante el análisis de polimorfismos en los patrones de separación electroforética de proteínas totales e isoenzimas.

Perspectiva de la investigación en biotecnología en mango en el CENIAP

A fin de afinar la metodología para producir plantas normales a partir de los embriones somáticos, se probará el efecto de las sales B_5 de Gamborg *et al.*, (1968) las cuales han sido señaladas como beneficiosas para la maduración normal de los embriones somáticos del mango (Litz 1984a) Una vez establecidos los protocolos de regeneración *in vitro* de las plantas, se iniciaran los programas de transformación genética mediante la incorporación de genes a través de sistemas biológicos (*Agrobacterium* spp.) o mediante la biobalística o electroporación de secuencias de ADN, relacionadas con la resistencia a los principales patógenos, anteriormente mencionados, principalmente para la resistencia al ataque de *Erwinia carotovora*.

De igual manera, se calibrarán metodologías para el aislamiento del ADN, para la caracterización molecular mediante restricción enzimática (R.F.L.P.) o a través de la amplificación al azar de ADN polimórfico. Estas metodologías de caracterización permitirán la identificación de los materiales pertenecientes a la colección de variedades del CENIAP, y servirá para ir caracterizando los materiales que se vayan manteniendo en condiciones *in vitro*, a fin de garantizar la uniformidad genética de los individuos regenerados.

Finalmente, se apoyaran a los programas de mantenimiento de colecciones de germoplasma mediante el desarrollo de protocolos de conservación *in vitro* de los materiales de la colección.

Conclusiones

El mango es un cultivo tropical de importancia económica, cuyo mejoramiento genético es imprescindible para el impulso de su producción comercial. El caso venezolano es de especial interés, debido a la ventaja de producir mango en épocas donde los principales productores todavía no han logrado sus cosechas.

Debido a que le mejoramiento genético tradicional es difícil en el mango, la Biotecnología se presenta como una estrategia eficiente para la producción de plantas con características agronómicas deseables. Sin embargo, se necesitan protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de plantas. Los resultados preliminares se han basado en la regeneración de plantas por embriogénesis somática a partir de tejido nucelar o de embriones cigóticos inmaduros.

En el CENIAP, se han establecido los ápices caulinares en condiciones *in vitro*, pero la regeneración de plantas no ha sido posible. Se calibró la metodología para la inducción de embriogénesis somática en las variedades de la colección del mango del Centro. Los principales materiales se han caracterizado por electroforesis de proteínas totales e isoenzimas. Se inician los trabajos en transformación genética, así como en caracterización de ADN y en conservación *in vitro* de germoplasma.

Bibliografía consultada

DEGANI, C.; EL-BASTRI, R.; GAZIT, S. 1990. Enzyme polymorphisms in mango. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(5):844-847

DeWALD, S. G.; LITZ, R. E.; MOORE, G. A. 1989. Maturation and germination of mango somatic embryos. Journal of the American Society for Horticultural Sciences. 114(5):837-841.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158

JANA, M. M.; NADGAUDA, R. A.; RAJMOHAN, K.; MASCARENHAS, A. F. 1994. Rapid somatic embryogenesis from the nucelii of monoembryonic mango varieties. *In vitro* cell. And Dev. Biol. Plant. 30(1):55-57.

LITZ, R. 1984a. *In Vitro* Somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. HORTSCIENCE 19(5):715-717.

LITZ, R. 1984b. *In Vitro* Somatic embryogenesis from Mangifera callus. SCIENTIA HORTICULTURAE 22:233-240.

MATHEWS, H.; LITZ, R. E. 1990. Kanamycin sensitivity of mango somatic embryos. HortScience 25(8):965-966

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497

SALAZAR, E; HERNÁNDEZ, Y.; SALDAÑA, G. 1993. Cultivo de embriones inmaduros de mango (*Mangifera indica* L.). Resúmenes de la XLIII Convención anual ASOVAC. Acta Científica Venezolana vol 44 (supl 1):45

Estado actual de la biotecnología aplicada a frutales en Bolivia*

Carmen L. Villarroel

Ladislao Vallejos

Instituto Boliviano de tecnología Agropecuaria

Introducción

Bolivia, al contar con una variación de condiciones ecológicas en las distintas regiones, cuenta con zonas aptas para la producción diversificada de frutales. Actualmente, se está incentivando cada vez más la actividad frutícola, tanto en los valles como en los trópicos. Sin embargo, los métodos tradicionales de propagación por presentar bajas tasas de multiplicación, no llegan a satisfacer las expectativas del mercado en cuanto a volúmenes de producción y calidad sanitaria, debido principalmente a que estos métodos, al no contar con un estricto control sanitario de inicio, permiten la difusión de enfermedades, principalmente virales y bacterianas, las cuales provocan la degeneración de los cultivos, la contaminación de los suelos y una paulatina reducción de rendimientos generación tras generación.

La búsqueda urgente de soluciones a corto plazo, en Bolivia, inicialmente se dirigió a la importación de material vegetal *in vitro* sin considerar la implementación de facilidades a nivel local, dando como resultado la inexistencia virtual de laboratorios de cultivo de tejidos en nuestro medio.

Diagnóstico general sobre cultivos frutícolas

Banano: la superficie actual cultivada de banano, en el departamento de Cochabamba, es de 14 000 ha, de las cuales únicamente 150 ha, son cultivadas en forma tecnificada, para la exportación. La introducción de nuevas variedades, trajo consigo problemas de tipo fitosanitario, entre los más importantes a saber, la sigatoka amarilla del banano causada por *Mycosphaerella musicola*, el mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* y el ataque de insectos (*Trips* spp.) que dañan la calidad del fruto.

Piña: la superficie cultivada de piña en Cochabamba, alcanza a 1 000 ha, exportándose a Tucumán, Argentina, pequeños volúmenes de las variedades Cayena lisa y Pucallpa o criolla. Entre los principales problemas fitosanitarios se tienen, la pudrición seca, causada por *Penicillium funiculosum* y *Fusarium moniliforme*, la fusariosis y la rajadura corchosa causada por *Fusarium subglutinans* y *Penicillium funiculosum* respectivamente, y la cochinilla de la piña (*Dismicoccus brevipes*) que ataca a toda la planta.

Como solución inmediata a los problemas de banano y piña, en el período 1991-1992, el Programa IBTA-Chapare importó 59 000 vitro-

plantas de banano de la variedad Gran Enano, procedentes de Agrobiotecnología-Costa Rica; en el período 1992-1993, se introdujeron 184 000 vitroplantas de banano de las variedades Gran Enano y Williams, 90 000 vitroplantas de piña de las variedades Cayena lisa, Queen Tahití, Spanish y Manzana, de AGRISTAR-EEUU, VITROPIC-Francia y Agrobiotecnología-Costa Rica. La cantidad total importada fue 333 000 plántulas *in vitro*, traduciéndose en un monto de 289 710 \$us (0,87 \$us/plántula) monto con el cual podría haberse implementado un laboratorio de cultivo de tejidos con las facilidades mínimas, de haber existido algún tipo de asesoramiento. Pese a estos aspectos, en octubre de 1993, se implantó el laboratorio de biotecnología en la Estación Experimental «La Jota», dependiente del Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria (IBTA) donde se inició la calibración de protocolos y la micropropagación de banano de las variedades Gran Enano, Guayaquil y Criolla; esta producción no comenzaba a abastecer los requerimientos, por lo que en el período 1993-1994, se introdujeron 155 000 vitroplantas de banano de las variedades Gran Enano y Williams, 10 000 vitroplantas de piña de las variedades Manzana y Champaca, procedentes de VITROPIC-Francia. Hasta diciembre del presente año, se tiene programado producir 45 000 plántulas de banano. En un diagnóstico preliminar realizado a campo, en plantaciones de banano provenientes de plántulas *in vitro*, se estimó que existe cerca de 4% de plantas con variaciones somaclonales, entre las más frecuentes se observaron plantas con enanismo y valorizadas o gigantes, y en menor frecuencia las que presentan hojas con masada u otras malformaciones.

Naranja: en los años 70, este fruto era de exportación, cerrándose a la fecha el mercado externo, debido a problemas de tipo fitosanitario. Actualmente, 5 000 ha se encuentran cultivadas por la variedad Criolla y una pequeña superficie con la variedad Valencia Tardía.

Entre los principales problemas podemos mencionar a la gomosis de los cítricos causada por *Phitophthora* sp. y la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*) Actualmente, no existe ningún laboratorio que se dedique a la micropropagación de este cultivo, pero a partir de 1995, el IBTA-Chapare iniciará investigaciones preliminares.

Vid: actualmente, el cultivo de la vid se realiza en forma tradicional sin ningún asesoramiento técnico, por lo cual los rendimientos que se obtienen son bajos, oscilando entre las 8 t/ha. Entre los principales problemas fitosanitarios en orden de importancia tenemos, la Agalla de corona, causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, no existiendo a la fecha, ningún tipo de control; el Mildiu de la vid, causado por el hongo *Plasmopara vitícola*, la Cenicilla causada por el hongo *Unicula necator*, Botrytis causada por el hongo *Botrytis cinerea* que ataca a los brotes tiernos y racimos, causando pérdidas significativas en la cosecha, el virus del enrollamiento, virus del mosaico clorótico y virus de la corteza corchosa.

Durazno: es un cultivo que se ha ampliado y tecnificado en los últimos años, principalmente en el área del departamento de Cochabamba, Chuquisaca y Tarija; con el apoyo de la Misión Técnica Suiza se incentivó la implantación de huertos con las variedades Gumucio Reyes y Saavedra. Actualmente se cuenta con 112 ha concentradas en el Valle Alto del departamento de Cochabamba, con un rendimiento de 16,7 t/ha. Entre los problemas fitosanitarios tenemos: el Oidium causado por *Sphaeroteca pannosa*, la Agalla de corona causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, diseminada en todas las zonas frutícolas causando pérdidas de 30 a 40% y el taladro del duraznero (*Chiysobatriss* sp), entre otros.

Manzano: en los valles mesotérmicos, no existen plantaciones de manzano en gran es-

cala, sólo en áreas con microlimas muy favorables para su cultivo, se cultivan las variedades Red delicious, Gala y Granny Smith, donde los agricultores aún no realizan un buen manejo de sus huertos. Los rendimientos fluctúan entre 8 y 10 t/ha. Entre los principales problemas fitosanitarios se encuentran el Oidium (*Oidium farinosum*) la Sarna del manzano causada por *Venturia enaequales*, la Agalla de corona, causada por *Agrobacterium tumefaciens*, y algunas plagas como el pulgón y la cochinilla.

No existe ningún laboratorio que se dedique a la micropropagación de los cultivos de vid, durazno y manzano, sin embargo, dentro del marco institucional del IBTA, está contemplada la implementación de las facilidades de un laboratorio de cultivo de tejidos para apoyar la producción e investigación del Programa Frutales y Hortalizas, con la micropropagación de plántulas *in vitro* de alta calidad fitosanitaria.

Frutilla: respecto a este cultivo, no se tienen datos, sin embargo, se sabe que desde 1988, empresas privadas dedicadas a este cultivo han estado importando anualmente, aproximadamente 50 000 plántulas *in vitro* de las variedades Selva, Douglas, Oso Grande, Chandler y Pájaro Californiano, provenientes de los Angeles - California, Santa Rosa - Chile y Mendoza - Argentina. Pese a existir en Bolivia tres laboratorios de biotecnología, que se dedican a la micropropagación comercial de este cultivo, la producción no abastece los requerimientos internos, por otra parte, existe una falta de comunicación con los productores.

En general, las distancias y la falta de acceso a ciertas áreas frutícolas hacen que exista una deficiente comunicación con los centros de consumo y comercialización.

Laboratorios de biotecnología

A través de la Red Boliviana de Biotecnología, en el año 1993, se logró establecer un primer contacto con los laboratorios de Biotecnología existentes en Bolivia, con la realización de la Primera Reunión de Biotecnología, efectuada en la ciudad de Cochabamba. Actualmente, se cuenta con diez laboratorios de cultivo de tejidos, de los cuales seis dirigen su actividad a cultivos frutícolas (banano, piña y frutilla, principalmente).

Respecto al resto de laboratorios, existe cierta predisposición a prestar apoyo a otras actividades, en cuanto a facilidades de laboratorios se refiere.

A continuación, se presentan los laboratorios y actividades que realizan (información extraída de las memorias de la I Reunión Boliviana de Biotecnología; Cochabamba, 13-14 de diciembre de 1993).

Universidad Santo Tomás - SAGRICA:

Actividades:

- Investigación en embriogénesis somática en rosas.
- Producción en micropropagación en clavel, piña y frutilla.

Especies en las que trabaja:

- Clavel
- Piña
- Frutilla

Ofertas del Laboratorio:

- Entrenamiento en servicio.
- Plantines fase IV de piña

Proyecto IBTA-Chapare. Laboratorio de Biotecnología C.D.A. La Jota. Casilla 4067. Teléfono 21543, Fax 441-7214. Cochabamba, Bolivia.

Actividades:

- Investigación en micropropagación de banano, piña, tembe.
- Producción en micropropagación de banano y piña.

Especies en las que trabaja:

- Banano
- Piña

Ofertas del Laboratorio:

- Vitroplantas de banano III, IV y V.
- Hijuelos de vitroplantas de piña.

Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Forestales (F.C.A.P.F) Universidad Mayor de San Simón. Laboratorio de Biotecnología. Cochabamba - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en estudio en la micropropagación de plántulas de ajo y banano.
- Producción en micropropagación de ajo.

Especies en las que trabaja:

- Ajo
- Banano

Ofertas del Laboratorio:

- Entrenamiento en servicio.
- Pasantías.

Laboratorio Vitriphyton. Casilla 2144, Teléfono 60465-61710, Fax 61220. Cochabamba - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en tecnología y ajuste de medios, para la producción masiva de especies frutales y ornamentales.
- Producción en micropropagación masiva de plántulas de frutilla, piña y ornamentales.

Especies en las que trabaja:

- Frutilla
- Piña
- Ornamentales

Ofertas del Laboratorio:

- Microplantas de frutilla y piña.

Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Facultad de Ciencias Agrícolas. Instituto de Investigación Agrícola «El Vallecito». Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Casilla 702, Teléfono 422130, Fax 342317. Santa Cruz - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en limpieza y propagación de clones de guineo Gros Michel, ajuste de medios de cultivo para especies leñosas y ajuste de medios de cultivo, para frutales tropicales y subtropicales.
- Producción en *in vitro* de semilla sana de yuca, camote y conservación de germoplasma.

Especies en las que trabaja:

- Yuca
- Banano

- Camote
- Stevia
- Pino
- Frutilla
- Ornamentales
- Forestales

Ofertas del Laboratorio:

- Clones de yuca y camote.
- Pasantías

INDUSTRIAS LAS. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Parque Infantil P.I.22, M-4 P.O. Box 2412, Teléfono 460415, Fax 464266. Santa Cruz - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en cultivo de ápices, variación somaclonal y conservación e intercambio de germoplasma *in vitro*.
- Producción en micropropagación - producción masiva comercial.

Especies en las que trabaja:

- Ananas comosus
- *Fragaria* sp.

Ofertas del Laboratorio:

- Capacitación a programas nacionales.
- Intercambio de Germoplasma *in vitro*.

Programa Agroquímico CORDECO-UMSS. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa Agroquímico. Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón. Casilla 992, Teléfono 32548, Fax (042) 33648. Cochabamba - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en micropropagación de especies nativas e introducidas (Puna, valle y trópico) y multiplicación *in vitro* de piretro.
- Producción en etapas de producción se iniciarán en 1995.

Especies en las que trabaja:

- *Acanthostyles buniifolius*
- *Baccharis dracunculifolia*
- *Hedeoma mandoniana*
- *Vetiveria zizanioides*
- *Minthostachys andina*
- *Mentha arvensis*
- *Mentha canadensis*
- *Chrysanthemum cinerariifolium*

Ofertas del Laboratorio:

- Apoyo en la formación académica (tesis) y capacitación en el área.
- Estudios de multiplicación por cultivo de tejidos en plantas aromáticas y medicinales, herbáceas y arbustivas.

Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria-IBTA. Programa de Investigación de la Papa - PROINPA. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Recursos Genéticos. Man Césped 293. Casilla 4285, Teléfono 49013, Fax 45708. Cochabamba-Bolivia.

Actividades:

- Investigación en optimización de medios de cultivo, limpieza viral, tuberización *in vitro*, conservación de germoplasma y caracterización taxonómica y electroforética de tubérculos andinos.
- Producción en micropropagación de variedades de papa libres de virus

Especies en las que trabaja:

- Solanum
- Oxalis
- Ullucus

Ofertas del Laboratorio:

- Limpieza viral y micropropagación de cultivos nativos de papa.
- Caracterización taxonómica y electroforética de tubérculos andinos.
- Entrenamientos en servicio de corta duración.
- Apoyo a la investigación en biotecnología.

Unidad Productora de Semillas de Papa; SEPA-SAM. Casilla 2144, Teléfono 60216, Fax 61220. Cochabamba - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en ajuste de medios y técnicas para mejorar la eficiencia en la producción masiva.
- Producción en provisión de plantines (180 000 año) para invernadero.

Especies en las que trabaja:

- Papa

Ofertas del Laboratorio:

- Apoyo a trabajos de tesis.

Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Casilla 4821, Teléfono 800095-351481, Fax 343063. La Paz - Bolivia.

Actividades:

- Investigación en resistencia de heladas en papa, Var. Sani Imilla y estudios de protoplastos en papa.
- Producción en producción de plántulas *in vitro* de papa.

Especies en las que trabaja:

- Papa

Ofertas del Laboratorio:

- Análisis químico de plantas
- Bioensayos
- Pruebas de germinación.

Principales aspectos que limitan el uso del cultivo de tejidos

Las principales limitantes del cultivo de tejidos en Bolivia, se refieren a los aspectos siguientes:

- Falta de personal especializado.
- Altos costos de implementación (infraestructura y equipos especiales).
- La adquisición de productos químicos no es inmediata, es costosa y difícil.
- La literatura relacionada a la técnica de cultivo de tejidos es escasa.
- Carencia de proyectos que incentiven la actividad de cultivo de tejidos en frutales, primero para abastecer el mercado interno y luego el externo.
- Falta de credibilidad por parte de personas involucradas con cultivos frutícolas, para aceptar la técnica de cultivo de tejidos, como solución a los problemas existentes.

Enfoque de solución a los problemas existentes

Por todos los aspectos indicados, la utilización del cultivo de tejidos es una alternativa de solución a la problemática existente en Bolivia, por las múltiples ventajas que ofrece. Es así, que a través de las redes existentes de Biotecnología en la Región y en América Latina, como IICA-PROCISUR, la Red BIO (FAO) y el INIBAP (caso particular del banano) se podría tener una serie de ventajas que permitirían un mayor acceso para la adopción de esta técnica.

Entre los aspectos de solución a mediano plazo, se contemplarían:

- Capacitación de los recursos humanos en las diferentes técnicas referidas a la biotecnología de frutales.
- Elaboración de proyectos en cultivos frutícolas de interés regional.
- Publicaciones técnicas, para la difusión de los resultados obtenidos.
- Transferencia horizontal de tecnología.
- Intercambio u obtención de material vegetal sano.
- Establecer una base de datos a nivel regional, la cual debe contener información sobre especies frutales de propagación vegetativa y sobre las técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas por los diferentes laboratorios para cada especie.
- Investigación para el establecimiento de métodos estándares, en laboratorios con mayor experiencia y acceso a la especie frutal en cuestión.
- Limpieza viral de frutales en proceso de degeneración y con mayor impacto en la región.

- Micropropagación de especies frutales comercialmente importantes.
- Conservación de germoplasma de especies frutales que son propagadas vegetativamente o de semilla recalcitrante, permitiendo mantener con seguridad las colecciones en espacios reducidos, libres de factores bióticos y abióticos, disminuyendo la mano de obra, manteniendo su calidad sanitaria y además facilitando el intercambio de germoplasma.
- Microinjertación de cítricos y frutales de carozo y pepita, que permitiría la obtención de plantas mejoradas en períodos reducidos, hasta su utilización.
- Fusión de protoplastos para la obtención de híbridos interespecíficos en frutales que presenten esterilidad a nivel de polen, como herramienta para el mejoramiento genético.
- Obtención de portainjertos y variedades mejoradas de cítricos a partir de suspensiones celulares provenientes de nucelas.
- Establecer modelos de embriogénesis somática para la propagación de especies frutales.

Conclusiones

La utilización de la biotecnología referida al cultivo de tejidos como técnica actual, permitirá llegar al agricultor, con materiales de excelente calidad genética y sanitaria en períodos de tiempo increíblemente cortos, comparados con las técnicas convencionales.

Transformación genética en lechosa (*Carica papaya* L.) para la incorporación de genes de resistencia a enfermedades

A. Vegas*, G. Trujillo**, J. L. Cabrera*** y L. Herrera-Estrella***.

* FONAIAP-CENIAP. Dpto. Biotecnología. Apdo. 4653. Maracay 2101.

** UCV. Fac. Agronomía. Secc. Fitopatología. Apdo. 4579. Maracay 2101.

*** Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)
Irapuato, México. Fundación Servicio para el Agricultor. Apartado 2224. Cagua.

La ingeniería genética permite ampliar la base genética de los cultivos mediante la incorporación de genes deseables. De esta manera hace posible la obtención de nuevas variedades de plantas, más rendidoras, resistentes a herbicidas, estrés hídrico o condiciones ambientales adversas, enfermedades y plagas, cuyos frutos contengan un mayor valor nutritivo y vida de almacenamiento.

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para introducir el ADN foráneo, en forma de plásmidos, a los tejidos de las plantas. Se puede incorporar el ADN directamente a los tejidos haciendo uso de los métodos directos, entre ellos: la biobalística, donde micropartículas recubiertas con ADN son impulsadas a las células y tejidos, liberando este ADN e integrándolo al ADN nuclear de la planta.

Debido al hecho de que las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* pueden infectar a las plantas en forma natural, induciendo tumores y raíces respectivamente, al introducir parte de su ge-

noma en el ADN de la planta, éstas han sido usadas ampliamente y se incluyen dentro de los métodos indirectos o mediados por vectores usados en las transformaciones genéticas de plantas.

Debido a la falta de disponibilidad de eficientes programas de control en enfermedades virales en plantas, la introducción de genes de resistencia a virus es de suma importancia en un manejo integrado de enfermedades. Se han incorporado genes que codifican para la proteína de la cápsula viral en plantas leñosas, como una vía de incrementar la tolerancia a un virus específico. Esta estrategia ha sido usada para el virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV) (Fitch *et al*, 1992; 1993) la cual ocasiona la enfermedad más importante que ataca este frutal, y ésta se encuentra más ampliamente distribuidas en las zonas productoras del mundo. El porcentaje de incidencia en las áreas donde se encuentra este virus llega a 100 %, y las lechosas se vuelven improductivas en uno a dos años después de haberse infectado (Vegas *et al*, 1983).

Investigaciones sobre la transformación genética de la lechosa

En experimentos realizados con una pistola de helio marca Dupont modelo PDS-1000, con sus accesorios (Sanford *et al.* 1991) se evidenció la expresión de los genes foráneos, sólo cuando se usaron plásmidos específicos para plantas dicotiledóneas, en tejidos de lechosa. Estos nuevos genes proporcionaron resistencia al antibiótico kanamicina, al herbicida fosfinotricin. Los tejidos se tiñeron de azul indigo en las pruebas de la enzima beta-glucuronidasa (Cabrera *et al.*, 1994; 1995).

La eficiencia de transformación fue mayor cuando se usaron embriones somáticos (25 clones transgénicos/gpf) en comparación de los embriones cigóticos (1 clón transformado en 100 embriones cigóticos) Además los embriones somáticos fue un tejido abundante por sus altas tasas de crecimiento y más fácil de conseguir que los embriones cigóticos (Cabrera *et al.*, 1994; 1995).

En los experimentos con *Agrobacterium rhizogenes* se demostró que la lechosa es susceptible a la bacteria y que la misma puede ser utilizada como un sistema para transferir genes en esa especie (Cabrera *et al.*, 1994; 1996) Aún cuando la cepa usada contenía sus oncogenes o genes de la patogénesis, y por lo tanto inducirá fenotipos anormales, éstos pueden ser ventajosos para ciertos propósitos y tendrán que ser evaluados para determinar como influyen en el porte de la planta, su adaptación a tierra o condiciones de estrés, en la floración y en la fructificación. En consecuencia, estos genes pueden ser útiles para crear nuevos genotipos y fenotipos y comprender como se regula el desarrollo en esta planta (Tepfer, 1989).

Para la evaluación de los riesgos biológicos de las plantas transgénicas hay que tomar en cuenta que la lechosa y las especies relacio-

nadas son todas autóctonas de la América Tropical, y en algunos casos pueden compartir las mismas condiciones agroecológicas (Storey, 1969) Aunque la lechosa es una especie de polinización cruzada y su polinización puede realizarse por el viento y por los insectos (Storey, 1969) su hibridación con las especies relacionadas no es viable, a menos que se realice el rescate de los embriones *in vitro* (Micheletti, 1958) por lo tanto no se hace necesario el aislamiento de las plantas transformadas. En las pruebas de campo, habría que evaluarse si los genes introducidos estimulan la agresividad de crecimiento y dispersión del cultivo y el potencial de hibridación con las otras especies, y si se afectan otros organismos en el ecosistema, como insectos polinizadores u organismos del suelo (Kapteijns, 1993) Como estas evaluaciones de campo no están a la disposición, se puede decir que las lechosas genéticamente modificadas pudieran considerarse organismos relativamente seguros, desde el punto de vista ecológico, tanto para los países latinoamericanos como para los otros países tropicales y subtropicales (Kapteijns, 1993).

Bibliografía citada

- Cabrera, J. A. Vegas and L. Herrera-Estrella. 1994. XX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Zacatecas. México. p.122.
- Cabrera, J. A. Vegas and L. Herrera-Estrella. 1995. Plant Cell Reports 15: 1-7.
- Cabrera, J. A. Vegas and L. Herrera-Estrella. 1996. In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant 32: 86-90.
- Fitch, M. R. Manshardt, D. Gonsalves, J. Slightom and J. Sanford. 1990. Plant Cell Reports 9:189-194.

Fitch, M., R. Manshardt, D. Gonsalves, J. Slightom, J. Sanford. 1992. *Biotechnology* 10:1466-1472.

Kapteijns, A. 1993. *Euphytica* 66: 145-149.

Micheletti, D. 1958. *Agro* 42: 7-21.

Sanford, J. 1990. *Physiologia Plantarum* 79: 206-209.

Storey, W. 1969. *In: Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. Editado por F. Feriverde, H. Veenman and N. Zonen. Wageningen. 511 p.

Tepfer, D. 1990. *Physiologia Plantarum* 79: 140-146.

Vegas, A. 1983. *Tesis de Maestría*. Universidad Central de Venezuela. 139 p.

El cultivo de tejido como una herramienta para la propagación asexual y el mejoramiento de la lechosa (*Carica papaya* L.)

A. Vegas*, G. Trujillo, R. Tovar***, y M. Tortoledo******

*FONAIAP-CENIAP. Dpto. Biotecnología. Apdo. 4653. Maracay 2101.

**UCV. Fac. Agronomía. Secc. Fitopatología. Apdo. 4579. Maracay 2101

***Central El Palmar. Apdo. Postal 1623. Caracas.

****Fundación Servicio para el Agricultor. Apartado 2224. Cagua.

Basados en las investigaciones sobre el cultivo de tejidos de la lechosa de los últimos 20 años y aprovechando su plasticidad *in vitro*, se han desarrollado una serie de técnicas eficientes en la propagación asexual de materiales élites; la conservación *in vitro* de germoplasma; el rescate de embriones híbridos en cruces interespecíficos entre Caricas; el saneamiento de enfermedades de origen bacteriano y viral y la evaluación de posibles variantes somaclonales. Este desarrollo de sistemas *in vitro* ayudan a complementar los programas de mejoramiento genético de la lechosa.

Investigación sobre la propagación asexual y el mejoramiento de la lechosa aplicando las técnicas biotecnológicas

Se realizaron una serie de experimentos con diferentes tejidos de plantas de lechosa, con el fin de demostrar su potencialidad como método de propagación asexual de materiales genéticos sobresalientes y como una herramienta en su mejoramiento genético.

Con respecto a la propagación asexual, se han establecido meristemas, yemas apicales y axilares de plantas jóvenes y adultas de campo, en medios de cultivo sólidos, constituidos por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) suplementados con las sustancias de crecimiento ANA (0,08 mg/l) y BA (0,4 mg/l) (medio de multiplicación) (Tovar, 1989) o en el medio sugerido por Fich, 1993, que contiene las sales básicas de MS con cinetina (0,1 mg/l) y BA (0,2 mg/l) (medio de germinación) en condiciones de fotoperíodo de 16 horas diarias de luz, de 1 000-1 500 lux y una temperatura de 25 °C. En estos mismos medios se obtiene una alta tasa de multiplicación después de varios reciclajes al medio fresco, cada 30 días, tanto en tejidos jóvenes como adultos. El enraizamiento de los brotes se logró en un alto porcentaje en el medio MS a la mitad suplementado con de AIA o AIB (2 - 5 mg/l) (Tovar, 1989) o tratándolos con una solución de 0,01- 0,025 mg/l de AIB, por 10 min y luego transfiriéndolos a medios MS. Las plantas enraizadas se aclimataron con éxito y posteriormente se han llevado a campo donde crecieron normalmente. No se observaron diferencias aparentes con respecto a las plantas madres que les dieron origen.

Para la germinación de semilla fresca *in vitro* se ha encontrado que medios de multiplicación y de germinación estimulan los porcentajes de germinación, en comparación con los medios más simples MS básico y agar- agua, igualmente la eliminación de la sarcotesta y la realización de tres cortes en las semillas, uno tangencial longitudinal y dos transversales, en ambos lados de la semilla, sin dañar el embrión.

En contraste a la siembra de semilla, la siembra de embriones cigóticos es más eficiente aunque más laboriosa, ya que se logra siempre una respuesta en los medios MS básico y medios de multiplicación y germinación; en el primero ocurre la germinación y en los otros la proliferación de brotes.

En una investigación utilizando como explantes hojas de lechosa con pecíolos, se logró inducir la organogénesis directa e indirecta (la formación de yemas adventicias de hojas, tallos y raíces *de novo*, a partir o no de una fase de callo) en medios MS (con las sales minerales reducidas a la mitad) con diferentes niveles de ANA (0 - 0,1 mg/l) y BA (0 - 5 mg/l).

Se realizaron otros experimentos para inducir la embriogénesis somática (ES) mediante la producción de embriones *de novo*, en medios de cultivo MS con 2,4-D, a partir de diferentes explantes: embriones cigóticos, hojas con meristemos axilares y raíces. Los tipos de explantes influyeron en cuanto al tiempo y porcentajes de aparición de estos embriones. En los embriones cigóticos ocurre la ES más rápidamente, entre los 15 y 30 días, mientras que en los ápices, las hojas y raíces, fue más tardía y sucedió después de los 30 días. De igual manera el porcentaje de ES en los embriones cigóticos fue alto, 81%, en los ápices intermedio (hasta 44%) y para las hojas y raíces fue más bien bajo, entre 2 y 7%, respectivamente. En las hojas, el porcentaje aumentó cuando se incluye el meristemo axilar (de 2% hasta 38%) y en el caso de las raíces, sólo

ocurre la ES, cuando el explante contiene el meristemo y en los entrenudos de la raíz no hubo formación de ES.

Aún cuando la embriogénesis somática en ápices, hojas con pecíolo y en las raíces fue baja y tardía, se justifica su uso en la propagación asexual de materiales élites seleccionados en los programas de mejoramiento genético, pues como ha quedado demostrado en los ensayos de campo, las plantas producidas fueron fieles al tipo, mantuvieron su sexo y las características morfológicas en los períodos vegetativos y reproductivos de cada población, sin embargo habría que estudiar la segregación de la F_2 .

A lo largo de la investigación se comprobó la capacidad de regeneración adventicia de los tejidos de lechosa *in vitro* (embriones cigóticos, hojas, raíces, ápices) en los que el vigor y la posibilidad de regenerar plantas vía organogénesis o embriogénesis se mantuvo, lo que hace posible conservar los materiales por largos períodos de tiempo, sin deterioro de los mismos.

Los conocimientos adquiridos en la regeneración de plantas de lechosa en este trabajo, sentó las bases para la continuación de los estudios del mejoramiento genético de este cultivo, implicando el uso de las hibridaciones, mutaciones e ingeniería genética.

Entre los trabajos de mejoramiento genético se destacan las polinizaciones efectuadas a las flores ginóicas o femeninas de *Carica papaya* con las flores andróicas o masculinas de *Carica cauliflora*. Una vez transcurridos tres meses de la polinización, los frutos cuajados se disectaron en el laboratorio, donde se extrajeron y cultivaron los híbridos, en su mayoría originados por la formación de muchos embriones o poliembriónía cigótica *in vivo*. En ningún momento se observó embriones somáticos del tejido nucelar. De las experiencias desarrolladas, se recomienda el culti-

vo de óvulos o embriones híbridos en medios de cultivo sin auxinas para evitar la formación de embriones secundarios y el incremento de embriones anormales. Los embriones germinados formaron plantas completas y se aclimataron en 7 u 8 meses. Estos estudios por lo tanto demuestran que la hibridación interespecífica seguida de el cultivo de óvulos y de embriones inmaduros parece ser un método factible para la transferencia de genes entre la especie silvestre y la cultivada (Manshardt and Wenslaff, 1989).

A continuación se describen la apomixis, la poliembriónía *in vivo* y el rescate de embriones de semillas aparentemente vanas, fenómenos botánicos observados en la lechosa, que el cultivo de tejidos puede hacerlos accesibles para incorporarlos al mejoramiento de esta planta.

En plantas de lechosa ginóicas aclimatadas en campo, se ha notado la formación de frutos a partir de flores cerradas, antes de la antesis. Este fenómeno a favor del cual se produce un embrión sin fecundación previa se conoce como apomixis. Los embriones originados podrían ser cultivados, a fin de lograr genotipos interesantes para los programas de mejoramiento de la lechosa. Como la apomixis está bajo control genético y está gobernada por uno o más loci (Asker, 1979) sería interesante mediante las nuevas tecnologías (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción, RFLP; y ADN polimórfico amplificado al azar, RAPDS) el aislamiento y uso de estos genes. En estas plantas y otras plantas de lechosa

de semilla evaluadas, la apomixis es quizás una forma más generalizada de reproducción asexual.

En una población de lechosa se ha encontrado una frecuencia baja (5 en 3 000 semillas) de poliembriónía *in vivo* y en otras se han rescatado embriones procedentes de semillas vanas, sin endospermo. El estudio citogenético y las evaluaciones de campo de estos materiales están en proceso.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido cido desoxirribonuléico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BA	Bencilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
mg/l	Miligramos por litro
min	Minuto
MS	Medio básico Murashige and Skoog.

Bibliografía citada

- Asher, S. 1979. Hereditas 91: 231-240.
- Fitch, M. 1993. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 205-212.
- Manshardt, R. and T. Wenslaff. 1989. J. Amer. Soc. Sci. 114: 689-694.
- Tovar, R. 1989. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía U.C.V. 59 p. 74 p.

Uso de la biotecnología para la obtención de especies de frutales resistentes a nematodos

Zoraida Suárez H.

*Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
Departamento de Protección Vegetal.*

Los nematodos constituyen uno de los factores fitosanitarios limitantes en la producción de frutales de importancia económica, entre los cuales se encuentran cítricos, musáceas, parchitas, piñas, guayabas, papayas y melones. Son organismos microscópicos y atacan a las raíces causando una disminución en la capacidad de la planta para absorber agua y nutrimentos, por lo tanto, la expresión en el follaje se manifiesta como una deficiencia de nutrimentos, reducción del crecimiento, flacidez de las hojas en las horas de mayor calor, disminución de la producción y en casos extremos la muerte de la planta, lo cual requiere de un manejo integrado mediante la aplicación de diferentes medidas de control.

La biotecnología no es la panacea para resolver todos los problemas en nematología y en la agricultura, pero constituye una herramienta poderosa que pueda ser usada en diferentes áreas de esta ciencia (Rebois, 1986; Kaplan y Davis, 1987), como por ejemplo:

- En taxonomía puede cubrir la taxonomía bioquímica, identificación de genes, mapeo de genes, uso de híbridos, secuencia de ácidos nucleicos y temas similares.
- En el desarrollo de las estrategias de biocontrol que involucren el cultivo y pro-

ducción masiva de agentes bioreguladores. Aislamiento e identificación de toxinas naturales de los agentes bioreguladores para hacerlos más virulentos o alterar sus rangos de hospederos, reconocimiento del huésped o adaptabilidad ambiental para obtener bioreguladores mejores y más seguros.

- La determinación de la naturaleza básica de la interacción hospedero-parásito, y su aplicación al conocimiento para inducir o incorporar resistencia dentro de los cultivos susceptibles de la misma o diferentes especies requerirá del uso de la biotecnología.
- Lo mismo puede decirse para los estudios del conocimiento básico en la fisiología de los nematodos donde la biotecnología permite conocer los requerimientos de las especies de nematodos fitoparásitos y desarrollar medios de cultivos para ellos (Mai y Riedel, 1987).

La factibilidad de aplicar la biotecnología a la nematología se debe a los avances de las ciencias físicas, en las técnicas de cromatografía, HPLC, HPTLC, espectrometría de masa, espectrometría por resonancia nuclear, electroforesis, puntos isoeléctricos, micromanipu-

lación, etc., lo cual permite ahora pensar en un simple nematodo, una simple célula y un simple análisis de genes.

La creciente demanda de medidas de control más seguras, más eficientes y menos contaminantes, unido a la salida del mercado de varios nematicidas, ha hecho que los nematólogos tengan que recurrir a la biotecnología para generar las soluciones esperadas, siendo la producción de plantas resistentes una alternativa viable y para lograrlo se requiere del conocimiento de los mecanismos involucrados en la resistencia a los nematodos.

Mecanismos de resistencia a nematodos

En el estudio de los mecanismos de la resistencia en la planta que limitan el desarrollo de los nematodos, se han sugerido diferentes hipótesis:

Autor (es) y mecanismos

Veech (1982), Huang (1985)

Producción de fitoalexinas especialmente en las formas sedentarias.

Gommers (1981)

Hay discrepancia entre los efectos in vivo e in vitro en los compuestos nematicidas y su presencia no necesariamente confiere resistencia.

Kaplan & Keen (1980)

La incompatibilidad a los nematodos se expresa después de la infección y un mecanismo activo involucra la producción de compuestos postinfeccionales, más que los preformados.

Giebel (1974)

Las enzimas efectúan cambios en los reguladores de crecimiento, fenoles libres, composición de aminoácidos y lignificación inducida, que limitan el desarrollo del nematodo.

Veech (1982)

Reitera la importancia de las plantas no hospederas como modelo para estudiar la resistencia.

Para el estudio de los mecanismos que limitan el desarrollo de los nematodos, Kaplan y Davis (1987) se basaron en las interacciones hospedero-parásitos, estableciendo los términos de **incompatible** para designar las interacciones mortales para el desarrollo del nematodo, lo cual ocurre en plantas resistentes; **compatible** para identificar a las interacciones favorables al desarrollo de nematodos en plantas susceptibles; **tolerantes** para indicar los efectos en el crecimiento de las plantas como resultado de la infección de los nematodos, e **intolerante** para identificar a las plantas cuyo crecimiento es afectado por los nematodos.

Las interacciones de incompatibilidad pueden ser activas o pasivas. Las interacciones activas dan como resultado reacciones de hipersensibilidad, caracterizándose por la localización rápida de células necrosadas y la detención del desarrollo del nematodo; mientras que las interacciones de incompatibilidad pasiva involucran factores constituyentes inhibitorios que afectan la eclosión de los huevos, localización de la fuente de alimentación y conveniencia del hospedero.

Keen y Bruegger, citados por Kaplan y Davis (1987) propusieron un modelo para la resistencia activa de los patógenos de las plantas, el cual es aplicable a la incompatibilidad con los nematodos fitoparásitos. Los autores señalan que las reacciones patógeno-incompatibilidad involucran dos fases:

Fase Determinativa en la que los patógenos potenciales son detectados por las células de las plantas y se genera un signo para iniciar la respuesta de hipersensibilidad. Esta fase incluye infección, fenómenos de reconocimientos, activación o desactivación de genes, incremento de la síntesis de m-ARN, y termina con la transcripción de ADN.

Los fenómenos de reconocimiento en las interacciones de compatibilidad o incompatibilidad están basados en los componentes superficiales de los organismos que están en contacto. Las plantas presentan ciertas proteínas o glicoproteínas llamadas «lectinas» que son capaces de unirse a sacáridos específicos del patógeno. Sequeira (1878) señala que los fenómenos de reconocimiento están más asociados a la susceptibilidad que a la resistencia. Por el contrario, Bell (1981) considera que los inductores contribuyen a disminuir o alterar la permeabilidad de la membrana conduciendo a la producción de fitoalexinas y la consecuente muerte celular.

Hasta el presente, en las interacciones planta-nematodo no hay claridad ni en las relaciones fisiológicas, ni en las bioquímicas de los factores de reconocimiento para la transcripción y traslación a los ácidos nucleicos. Esto también se aplica al conocimiento de los eventos bioquímicos que limitan el desarrollo de los nematodos (fase expresiva) (Kaplan y Davis, 1987).

Fase expresiva, involucra los complejos resultados de los eventos bioquímicos e incluye el traslado de m-ARN, síntesis de compuestos que son dañinos directa o indirectamente a los patógenos, modificación de la actividad enzimática, desorganización celular y concluye con la detección del desarrollo del patógeno.

La evaluación citológica por el microscopio de luz o electrónico provee conocimiento profundo en el tiempo, localización y aspectos

cualitativos de las respuestas celulares dentro de las raíces, que son dañinas para el desarrollo de los nematodos.

La mayoría de los estudios se han realizado en los nematodos sedentarios que son los más evolucionados y para su alimentación requieren de la modificación de las células de la planta, a través de las secreciones por el estilete, para inducir la formación de células denominadas células gigantes, sincitios o células nodrizas, las cuales se caracterizan por ser células de mayor tamaño, citoplasma denso, generalmente multinucleadas, núcleo y nucléolo de gran tamaño, con alto contenido de carbohidratos y aminoácidos. Estas células actúan como células de transferencia (Jones, 1981), indispensables para el desarrollo del nematodo. Estas reacciones se presentan en plantas compatibles; mientras que la producción de plantas resistentes (incompatibles) está dirigida a la alteración o disminución de la formación de estas células.

La penetración de los nematodos en plantas resistentes puede conducir a diferentes reacciones: 1) Las reacciones no específicas para la penetración de los nematodos (respuesta de daño) a menudo involucran necrosis limitada en el tejido, pero no disminuye el desarrollo del nematodo. 2) Las reacciones de hipersensibilidad ocurren inmediatamente después de la invasión de tejidos incompatibles donde los nematodos usualmente establecen su sitio de alimentación. 3) Los nematodos pueden tener éxito en la iniciación de los sitios de alimentación en las raíces donde normalmente inducen las reacciones de hipersensibilidad, pero su desarrollo o potencial reproductivo está limitado por el sitio de alimentación anormal. En frutales como cítricos se han observado estas reacciones de resistencia al nematodo de los cítricos *Tylenchulus semipenetrans* (Kaplan, 1981) y en vides con resistencia a *Xiphinema index* (Weischer, 1982).

Los estudios de la resistencia comprende los aspectos de atracción y penetración del patógeno a la planta, la producción de enzimas para degradar las paredes de planta y de toxinas, estudios de permeabilidad de las membranas, de las relaciones de agua en las células, del metabolismo de los carbohidratos y compuestos fenólicos, del balance hormonal de los procesos de transcripción y traslocación, etc.

En cada uno de estos aspectos se encuentran involucrados compuestos enzimáticos cuya acción determina el éxito o no de la interacción hospedante-parásito, por lo que los estudios enzimáticos permiten conocer las alteraciones metabólicas en la planta, producto de la infección y por ende, con mayor profundidad el daño causado por el patógeno y sus posibles vías de combate.

Las enzimas constituyen un grupo de proteínas de importancia biológica, ya que son catalizadores en las células vivas. En las plantas la respiración se incrementa cuando ocurre una herida o daño. En esta respiración no media la enzima citocromo oxidasa sino tres oxidases terminales que son resistentes a la cianida, por lo que se conoce como «respiración cianida-resistente» (RCR) la cual es un requisito para que se activen los mecanismos de defensa en la planta. La síntesis de ácido ascórbico dependiente de las proteínas que contienen hidroxiprolina está asociada con la RCR en la mitocondria. La RCR genera peróxidos de hidrógeno de los cuales los superóxidos son generados por la peroxidasa, con los que se inician los procesos de inactivación del patógeno (Arrigoni, 1979) Los superóxidos son extremadamente tóxicos y pueden difundirse a través de las células para oxidar grupos funcionales de enzimas y fosfolípidos, reducir las cadenas S-S y causar daños en macromoléculas y membranas. La superóxido dismutasa (SOD) normalmente funciona para limitar las concentraciones de superóxidos. Durante la RCR, la actividad de SOD dismi-

nuye y se acumulan superóxidos que suprimen el desarrollo del parásito y muerte de las células de la planta. La generación de superóxidos es aumentada en presencia del NADPH (Kaplan & Davis, 1987) Las NADPH oxidasa, las peroxidasas y la superóxido dismutasa disminuyen considerablemente mientras la RCR se realiza.

Los compuestos fenólicos son regulados por estas enzimas y otras del grupo del óxido reductasas. Los fenoles libres, los ortohidroxifenoles y flavanoles se encuentran en altas concentraciones en las plantas resistentes.

Fuentes de genes para la resistencia

Las plantas y los nematodos coexisten en una relación balanceada, lo cual ha permitido la coevolución a lo largo del tiempo geológico (Stone, 1977) y ha resultado en un balance en el sistema hospedero-patógeno. La interferencia del hombre con los sistemas de cultivos donde se utilizan cultivares resistentes ejerce una presión de selección en el organismo involucrado; esto permite el desarrollo de nuevas razas patogénicas, a partir de algunos individuos que llegan a su madurez y reproducción en plantas resistentes (Sasser, 1979) La mayoría de plantas resistentes se han desarrollado contra nematodos endoparásitos sedentarios, los cuales son altamente especializados (*Meloidogyne*, *Globodera* y *Heterodera*).

El mejorador requiere de una amplia base genética para la selección de caracteres que pueden tener valor para mejorar un cultivo. El incremento de la dependencia de pocos genotipos para la producción de alimentos y fibras, ha hecho que se seleccionen plantas resistentes a muchos patógenos. Afortunadamente algunos cultivos tienen un amplio pool de genes para resistencia a ciertos nematodos fitoparásitos; en otros, la probabilidad de encontrar altos niveles de resistencia es remota

(Fassuliotis, 1979) De allí la ventaja de disponer de los bancos de germoplasma.

Las plantas silvestres juegan un papel importante en la contribución de genes para la resistencia e incorporarlas al pool de genes de las plantas cultivadas. Sin embargo, mientras más remota es la relación, más difícil es transferir los genes deseados a un cultivo, por medio de los métodos de mejoramiento tradicional debido a la incompatibilidad sexual y diferencias en los niveles de ploides. Estos aspectos han sido superados con el uso de la biotecnología, mediante la inducción de mutantes o a través de ADN recombinante, variación somaclonal e hibridización somática por medio de la fusión de protoplastos (Fassuliotis, 1987).

Un serio problema para cualquier programa de mejoramiento es la longevidad y utilidad del desarrollo de un nuevo cultivar. La resistencia a un nematodo en particular tiene poco uso si es susceptible a otras enfermedades o plagas que prevalecen en el ambiente.

No es fácil el desarrollo de una resistencia múltiple en cultivares e híbridos de alta calidad, especialmente cuando los fitomejoradores deben agrupar genotipos de muchas fuentes. Algunos tipos de resistencia y la habilidad para rendir están controladas por diferentes genes y la resistencia a otros patógenos puede perderse durante el desarrollo de la resistencia a un nematodo en particular.

Aunque no es completamente necesario, es deseable entender las bases genéticas de la resistencia antes de intentar incorporar resistencia a un cultivo agrónomicamente aceptable. La expresión de la resistencia en un híbrido determina la facilidad con la cual la transferencia genética puede ser realizada en un programa de mejoramiento.

La información en la genética de las plantas resistentes a nematodos puede estar influen-

ciada por a) la raza o patotipo de los nematodos a ser probados, b) la base genética de una línea resistente, c) el efecto del medio ambiente en la expresión de la resistencia y d) el criterio usado para la cuantificación de la resistencia (Fassuliotis, 1979; Sasser, 1979) La determinación del número de genes que controlan la resistencia puede depender del nivel buscado por el investigador.

Producción de plantas resistentes a nematodos con el uso de la biotecnología

La regeneración de plantas a partir de parte de órganos, tejidos o células, parece ser una manera efectiva de obtener variaciones somaclonales con un aumento de resistencia a enfermedades (Litz, 1986) Estas mutaciones favorables están usualmente en los cambios de un simple gen o cambios citoplásmicos, con una frecuencia significativamente más alta que las observadas por los cambios genéticos espontáneos. Las variaciones somaclonales son más preferidas que el mejoramiento por mutaciones con radiaciones o químicas, debido a que las plantas son genéticamente más estables. Estas variaciones somaclonales pueden ofrecer una nueva forma de descubrir variantes que posean resistencia a nematodos y retengan las cualidades favorables de un cultivo existente, un método alternativo de combinación de genomas es por la hibridización somática a través de la fusión de protoplastos (Fassuliotis, 1987).

Litz (1986) realizó una revisión sobre la aplicación de los sistemas *in vitro* para modificar los germoplasmas y encontrar fuentes de resistencia a enfermedades, a través de los métodos siguientes:

Rescate de embriones: la aplicación de estos estudios en el mejoramiento de plantas involucra la separación y cultivo de híbridos

de embriones cigóticos después de la hibridación entre especies de plantas de importancia económica y las silvestres, pero especies sexualmente incompatibles (Fassuliotis, 1979; Litz, 1986) El rescate de embriones es ahora un procedimiento estándar para transferir genes o complejo de genes que confieren resistencia a especies de importancia económicas. El tomate (*Lycopersicon esculentum*) se hibridizó con *L. peruvianum*, que es sexualmente incompatible. Como resultado de este cruce, el endospermo no se desarrolló, consecuentemente el embrión abortó, pero por un aislamiento cuidadoso del embrión del híbrido en un medio para cultivo de tejidos, el desarrollo normal ocurrió.

La resistencia en lechosa o papaya al virus ring spot se logró al transferir genes de *Carica cauliflora* que es resistente a *Carica papaya* a través del rescate de embriones. La hibridación entre especies de *Cucumis* es difícil, pero se ha tenido éxito en un híbrido entre *C. metuliferus* y *C. anguria*, ambos a través del cultivo de embriones y embriogénesis somáticas de embriones cigóticos inmaduros, lo que ha incrementado la probabilidad de que el híbrido del melón verdadero tenga alta resistencia al nematodo agallador *Meloidogyne*.

Polinización y fertilización *in vitro*: la incompatibilidad sexual entre especies, también ha sido superada por este método, el cual involucra la fertilización de masas de óvulos separados por un polen germinado bajo condiciones estériles. Aunque este método no es usado para resolver las dificultades de los fitomejoradores, la técnica es considerada como potencial, debido a su simplicidad.

Fusión de protoplastos: la recuperación de un híbrido somático sería imposible de obtener usando la hibridación sexual convencional, lo cual ha sido posible por el desarrollo de un método eficaz para la producción en gran escala de células de plantas sin paredes o protoplastos. La fusión controlada de proto-

plastos de diferentes especies es posible con el uso de complementos bioquímicos de protoplastos en una selección de medios o cocultivando protoplastos que tengan varias diferencias celulares, tales como, pigmentación o tamaño de los plastidios. Los híbridos somáticos se han recuperado de protoplastos fusionados de berenjena *Solanum melongena* y *S. sisymbriifolium*, una maleza silvestre resistente a *Meloidogyne incognita*. En este caso, el primer paso fue el de la recuperación exitosa a partir de callos indiferenciados de *S. sisymbriifolium* (Fassuliotis, 1979).

Propagación clonal: el procedimiento del uso de cultivo de tejidos, tales como, del ápice de los brotes, embriogénesis somática y organogénesis, para la rápida propagación clonal se ha señalado para muchas especies. En los programas de mejoramiento que involucra la producción de semilla F_1 , la propagación de cultivo de tejido se ha usado para producir un alto número de plantas parentales, particularmente, plantas macho estériles, en orden a estandarizar la producción de semillas, tanto como sea posible. Hay interés en la producción de híbridos por semillas artificiales, a través del encapsulamiento de embriones somáticos o directamente por la siembra de embriones somáticos, asegurando que ciertas combinaciones con características de valor, tales como la resistencia a enfermedades, en las semillas propagadas puedan ser mantenidas indefinidamente.

Variación somaclonal: el paso de los tejidos en las plantas a través de un ciclo *in vitro*, particularmente a través de un callo, es ampliamente conocido que produce alteraciones genéticas en las células de las plantas que aparentemente son recuperadas. Esta inestabilidad del genoma en los cultivos de tejido ha sido el principal problema en la propagación clonal, debido a que la fidelidad estaba alterada. Ahora, se reconoce que los cambios inducidos de estos cultivos de tejido representan una fuente única de diversidad genética

en cultivos propagados vegetativamente (por ejemplo, papa, musáceas, etc.) y para el desarrollo de nuevas líneas en cultivo propagados por semillas. Esto es útil para el incremento de especies que tienen poca información genética disponible y para los genes enmascarados o complejo de genes que pueden ser incorporados en un programa de mejoramiento de plantas.

Las bases genéticas de la variación somaclonal son poco entendidas; sin embargo, en las plantas propagadas por semilla se han observado cambios en el número de cromosomas o estructura, mutaciones de un simple gen y en el ADN citoplásmico. Aunque en la mayoría existe evidencia de que las variaciones somaclonales están asociadas a alteraciones en los cromosomas, todavía hay especulación sobre los elementos responsables de estas variaciones.

Variación gametoclinal: cuando las condiciones *in vitro* estimulan la variabilidad en el cultivo de gametos masculinos (microsporas) se le refiere como variación gametoclinal. Los genes mutantes dominantes y recesivos inducidos por las condiciones del cultivo en plantas haploides pueden expresarse debido a que una simple copia de cada gen está presente.

Después de la recuperación de las plantas haploides de estos cultivos, el complemento de los cromosomas es restaurado a número diploide por el tratamiento de colchicina. La variabilidad gametoclinal puede ser útil para la resistencia enmascarada de ciertas enfermedades y plagas.

ADN Recombinante. Con el incremento de las técnicas de cultivo de tejido (aislamiento y cultivo de protoplastos, alta frecuencia de embriogénesis somática de las células, etc.) y con el alto entendimiento de la transformación natural de las células de la planta por *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria

que causa formación de tumor en diferentes plantas, la atención se ha restringido a la modificación o transformación de las plantas. Varios vectores se han propuesto para facilitar la introducción de fragmentos de ADN externo dentro de las células de la planta o protoplastos, incluyendo el plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Parte del plásmido Ti comienza a integrarse dentro del núcleo de la planta infectada del hospedero.

Para nematodos se realizan estudios con el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (B.t.) es gram positiva, formadora de esporas y caracterizada por la presencia de las inclusiones de la proteína cristalina parasporal, la cual es altamente tóxica y específica en su actividad. Los genes de las taxinas se han aislado, establecidas las secuencia y basados en el ADN recombinante, se han introducido en una bacteria endofítica.

Estos productos han sido encapsulados dentro de células estabilizadas de *Pseudomonas fluorescens* (P.f.) Los genes de B.t. introducidos en P.f. y expresado en niveles altos, forman inclusiones similares a las de B.t. Sin embargo, a diferencia de B.t. en las células no ocurre lisis ni esporulan durante la fase de crecimiento estacionario. Al final de la fermentación se añade un químico para matar y estabilizar rápidamente a las células e inactivar las enzimas proteolíticas. La presencia de razas y su especificidad por el ataque a grupos de las plantas y nematodos, así como la secuencia de aminoácidos y rango de hospederos, se establecieron inicialmente cuatro clases, pero posteriormente se añadieron dos clases principales, las clases CryV y CryVI que presentan toxinas activas para nematodos (Feitelson *et al.*, 1992).

La transformación de las células de las plantas también considera la inclusión por microinyección de ADN externo en el polen, ovarios y protoplastos. En algunos de estos estudios, el tubo del polen puede servir como

vector (Litz, 1986) Esta técnica incluye el uso de la ingeniería genética y la transferencia de genes (Rebois, 1986).

En nematología es reciente la incorporación de estas técnicas para producir plantas resistentes. Su aplicación ha tenido éxito en cultivos anuales como tomate, papa, berenjena y en frutales como melón y vid; sin embargo, poco es lo que se ha hecho en frutales perennes. La mayoría de la incorporación de resistencia se ha realizado por los métodos convencionales.

Limitaciones de la biotecnología

La biotecnología puede tener sus problemas y limitaciones. Por ejemplo, en la ingeniería genética un gen puede ser transferido para resistencia a un cultivo donde no existía antes. Sin embargo, el gen puede que no se exprese. Si el gen se expresa, puede haber consecuencias en términos de la interacción con otros genes en el organismo. En el futuro estos problemas pueden solucionarse con el uso de la biotecnología (Litz, 1986).

Ejemplo de la producción de plantas resistentes al nematodo agallador, caso guayaba

En Venezuela, los estudios sobre resistencia a nematodos se han dirigido a buscar fuentes de resistencia a través de evaluaciones de materiales genéticos. El único genetista que se interesó por este tipo de estudios fue el Dr. Asdrúbal Arcia en el cultivo del tabaco. En frutales nada se ha hecho en la búsqueda de esos materiales resistentes y su incorporación a los cultivos comerciales.

En el caso concreto del cultivo de la guayaba se presenta una grave problemática fitosanitaria en la cual el nematodo agallador

Meloidogyne, con las dos especies *M. incognita* y *M. arenaria* (Crozzoli *et al.*) constituye el factor limitante principal como organismo que causa daño directo, pero que también predispone a la planta al ataque de otros organismos y como consecuencia, la pérdida de gran cantidad de plantas. Por ello, en un esfuerzo por dar soluciones a este problema, se inició una serie de actividades mediante un equipo interdisciplinario e interinstitucional, cuyo objetivo principal es la producción de plantas resistentes a través del uso de la biotecnología.

Fassuloitis (1979) propuso los pasos a seguir en un programa de mejoramiento y que son aplicables al presente caso:

Identificación de las especies del nematodo agallador: en el Zulia se han encontrado poblaciones mixtas de *M. incognita* y *M. arenaria*.

Establecimiento de cultivos puros de las poblaciones de nematodos: en el caso de guayaba se busca resistencia a ambas especies, por lo que se presume que al seleccionar un material resistente a ambas especies, también lo será en forma individual.

Estudio de la variabilidad de las poblaciones de nematodos y su reacción en el germoplasma resistente: las poblaciones en el cultivo no han demostrado variabilidad; sin embargo, si son más agresivas en otros cultivos como tomate.

Para estudiar el germoplasma se realizan colectas de los tipos de *Psidium guajava* y especies de *Psidium* en la zona del Departamento Mara y se tienen programados colectas en diferentes partes del país.

Establecimiento de métodos para las pruebas de selección: en el laboratorio, las plantas estériles pueden ser colocadas en un medio de agar con solución de White modifica-

do. Los huevos deben estar desinfectados. La reacción de resistencia se puede observar de los 5 a 7 días.

Uno de los problemas que presentan las plantas de guayaba *in vitro* es la poca producción de raíces, lo cual puede superarse aumentando el contenido de auxinas. También se realizará la inducción de raíces con *Agrobacterium rhizogenes* para incorporar genes de resistencia.

En el umbráculo: el nivel de inóculo usado para la evaluación de los materiales es determinante para una confiable selección del material. Para establecer estos niveles se inocularon las especies *P. guajava* considerada susceptible y *P. friedrichstalianum* considerada como resistente en otros países. Se usaron 14 niveles para cada una de las especies de *Psidium*; ello servirá como punto de referencia para las futuras evaluaciones.

Pruebas de campo. Brindan la oportunidad de seleccionar los tipos de plantas agrónomicamente deseables. Sin embargo, no puede ser usado como método de selección inicial.

Los materiales que resultan resistentes, se llevan al campo y se realizan los registros de producción de frutos y otras variables importantes en el cultivo.

Fuentes de resistencia: en *Psidium* se ha señalado como resistentes a *P. friedrichstalianum*. En Cuba (Cuadra y Quincosa, 1982) se ha usado como patrones, pero en Venezuela se realizan las evaluaciones de plantas de *P. guajava* injertadas sobre *P. friedrichstalianum*, para observar la compatibilidad entre ambas especies. Además en la especie de *P. guajava* existe un material aparentemente resistente, no sólo a nematodo sino también a sequía.

La recolección de especies y/o tipos de *Psidium* permitirá disponer de un germoplas-

ma para ser usado en las evaluaciones para resistencia. Al determinar algún material interesante se podrá aplicar la biotecnología mediante cruces o hibridación interespecífica, mutación somaclonal o fusión de protoplastos.

Definir los mecanismos de resistencia: para ello, se realizará la caracterización bioquímica por electroforesis de *Psidium guajava* con dos tipos, uno susceptible y otro resistente; también en *P. friedrichstalianum*, con sus respectivos tipos. Con este estudio se espera establecer las bandas comunes que estén correlacionadas con la resistencia. El objetivo es el de establecer un protocolo que permita rápidamente y en forma confiable la evaluación de los materiales, sin necesidad de realizar las evaluaciones en umbráculo. Por otra parte se realizarán los estudios histológicos en ambas especies para determinar las primeras reacciones de resistencia. Simultáneamente se realizarán los cruces interespecíficos para observar la F1 y determinar la naturaleza de la resistencia.

El estudio de mejoramiento en frutales perennes es a largo plazo, sin embargo gracias a la biotecnología muchos de estos pasos se pueden acelerar y otros podrán ser reducidos para lograr plantas resistentes en menor tiempo y más duraderas.

En este estudio participan en forma activa:

Ing. Agr. Ana Casassa. Universidad del Zulia.

Ing. Agr. Máximo MatheuS. Centro Frutícola del Zulia.

Ing. Agr. Efraín Salazar. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Ing. Agr. Carolina Rosales. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Ing. Agr. Zoraida Suárez. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Lic. Miguel Alvarado. universidad de Zacatecas. México

Bibliografía

- ARRIGONI, O. 1979. A biological defense mechanism in plant. *In* F. Lamberti and C. B. Taylor, eds. Rootknot nematodes (*Meloidogyne species*) systematics, biology and control. New York: Academic Press. p. 457-467.
- BELL, A. A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of Plant Physiology. 32:21-81.
- CROZZOLI, R.; A. M. CASSASA; RIVAS, D.; MATHEUS, J. 1991. Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo del guayabo en el Estado Zulia. Venezuela. Fitopatol. Venez. 4:2-6.
- CUADRA, R.; QUIÑCOSA, A. 1982. Comportamiento de diferentes especies de *Psidium* como patrones para guayabos resistentes a *Meloidogyne*. Ciencias de la Agricultura. 13:19-26.
- FASSULIOTIS, G. 1979. Plant breeding for root-knot nematode resistance. *In* F. Lamberti and C. E. Taylor, eds. Root-knot nematodes (*Meloidigyne species*): Systematics, biology and control. New York, Academic Press. p. 424-453.
- FASSULIOTIS, G. 1987. Genetic basis of plant resistance to nematodes. *In* J. A. Veech and D. W. Dickson, eds. Vistas on Nematology, Florida. DeLeon Springs. pp. 364-371.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*. Insects and beyond. Biotechnology 10:271-275.
- GIEBEL, J. 1974. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes. A review. Journal of nematology. 6:175-184.
- GOMMERS, F. J. 1981. Biochemical interactions between nematodes and plant and their relevance to control. Helminthological Abstracts Serie B. 50:9-24.
- HUANG, J. S. 1985. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. *In* J. N. Sasser and C. C. Carter, eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vo. 1: Biology and Control. Raleigh, North Carolina State, University Graphics. p. 164-165.
- JONES, M.G.K. 1981. The development and function of plant cell modified by endoparasitic nematodes *In*: B. M. Zuckerman, W. F. Mai, and R. A. Rhode, eds. Plant parasitic nematodes Vol III. New York: Academic Press. p. 255-279.
- KAPLAN, D. T. 1981. Characterization of citrus rootstock responses to *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb). Journal of Nematology. 13:492-498.
- KAPLAN, D. T.; DAVIS, E. 1987. Mechanisms of plant incompatibility with nematodes. *In* J. A. Veech and D.W. Dickson, eds. Vistas on Nematology, Florida: DeLeon Springs. p. 267-276.
- KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T. 1980. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. Revue de Nematologie. 3:123-124.
- LITZ, R. E. 1986. Germplasm modification and its potential for finding new sources of resistance to diseases. Journal of Nematology. 18:18-22.

- MAI, W. F.;RIEDEZ, M. 1987. Culture of plant parasitic nematodes: importance of a germplasm bank. *In* J. A. Veech and D. W. Dickson, eds. *Vistas on Nematology*. Florida: DeLeon Springs. p. 398-400.
- REBOIS, R. V. 1986. Applications of biotechnology to nematology: Symposium introduction. *Journal of Nematology*. 18:1-2.
- SASSER, J. N. 1979. Pathogenicity, host ranges and variability in *Meloidogyne* spp. *In* F. Lamberti and C. E. Taylor, eds. *Root-knot nematode (Meloidogyne species): Systematics, biology and control*. New York: Academic Press. p. 257-268.
- SEQUEIRA, L. 1978. Lectins and their role in host-pathogen specificity. *Annual Review Phytopathology*. 16:453-481.
- STONE, A. 1977. Recent developments and some problems in the taxonomy of cyst nematodes. *Journal of Nematology*. 14:2-9.
- VEECH, J. A. 1982. Phytoalexins and their role in the resistance of plant to nematodes. *Journal of Nematology*. 14:2-9.
- WEISCHER, B. 1982. Histopathological studies on grape species with different degrees of resistance to *Xiphinema index*. *Nematologica*. 28:178-179. (Abstr.).

Mesa redonda sobre las perspectivas y posibilidades del uso de la biotecnología en la micropropagación y mejoramiento de frutales

Claret Michelangeli
Coordinadora

*Centro de Investigaciones de Biotecnología Agrícola
(CIBA). Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela*

La Dra. Michelangeli inició la discusión en la mesa redonda haciendo planteamientos concretos sobre el uso de la biotecnología tanto en la micropropagación como en el mejoramiento de frutales en el área andina:

- Es necesario identificar y priorizar los problemas que afectan la producción de los frutales en los países andinos. Entre ellos, sin duda alguna, destacan las plagas y enfermedades.
- La biotecnología ofrece una variedad de técnicas para resolver problemas en frutales, tales como: la micropropagación, el rescate de embriones, la producción de plantas libres de enfermedades, la conservación de germoplasma (respaldo de colecciones *in vivo*; como de especies semillas recalcitrantes) y las técnicas de ingeniería genética.
- Se debe tener en cuenta que los objetivos del mejoramiento son los mismos, se trate de resolverlos con el uso de técnicas biotecnológicas y/o con el mejoramiento genético convencional.
- Los investigadores deben estar claros al respondernos preguntas, tales como:

¿Quién resolvería los problemas en la producción de frutales en nuestros países?

¿Cuál sería la vía más factible para resolver los problemas, y cómo la biotecnología puede ayudar?

¿Quién se beneficiaría de los resultados obtenidos?

- Es necesario formar grupos interdisciplinarios e interinstitucionales dentro de cada país y plantearnos la realización de megaproyectos entre países sur y centroamericanos, para la solución de problemas comunes y obtención de recursos económicos por parte de organizaciones internacionales.
- No existen políticas oficiales definidas en nuestros países en cuanto a las bondades de la biotecnología, ni la legislación en cuanto a sus resultados. Esta situación podría solventarse mediante la creación de centros de investigación biotecnológica nacionales para cada país. Éstos se encargarían de resolver los problemas prioritarios y de la interacción entre centros, y servirían de base para la comunicación y la presentación de megaproyectos.

- Formación de recursos humanos en áreas deficitarias (Ej.: Biología Molecular).

La Ing. Zoraida Suárez sugirió crear una lista de fortalezas y debilidades de los frutales de cada país participante, para facilitar la identificación de los problemas y aprender de los grupos con más avance tecnológico. La Ing. cree en la maximización de los recursos mediante la coordinación de esfuerzos, haciendo equipos de trabajo que se formen espontáneamente más que de manera gubernamental. También señaló que al incorporar investigadores de otras áreas se promueve la eliminación de la imagen de exclusividad de la biotecnología.

El Ing. Raúl Salazar señaló que la Red Frutícola está recopilando la información acerca de los investigadores y sus áreas de trabajo. Enfatizó la necesidad de centralizar la información generada de cada sociedad o redes de información.

La Ing. Morela Fuchs planteó que la recién formada Sociedad Venezolana de Biotecnología está creando una base de datos de sus miembros, la cual pudiera ser enviada a otros países andinos a fin de tener conocimiento de las actividades que se desarrollan en Venezuela.

El Dr. Mauro Quiñones (Perú) señaló la importancia que tiene el material vegetal genético de Los Andes, y de que no existe royalty o protección para éste. Además, nuestros países adolecen de institucionalidad, impidiendo la continuidad y seriedad en cualquier investigación a mediano y largo plazo. Debido a que no hay estímulo económico los investigadores migran a otros países. Hay una tendencia hacia los parcelamientos científicos que restringen la ejecución de proyectos serios y multidisciplinarios. En otro orden de ideas él indica que las perspectivas de la biotecnología son muy grandes, pero su costo es elevado. Para disminuir costos se debe hacer uso

del efecto multiplicador de los investigadores que hayan podido salir de sus respectivos países a entrenarse en lugares con mayor avance tecnológico. Por último menciona que algunos países han obtenido buenos resultados a bajo costo con el empleo de la micropropagación.

La profesora Norka Mogollón propuso poner en práctica los resultados obtenidos en el laboratorio, a fin de aumentar la credibilidad en la biotecnología.

El Ing. Francisco Salcedo explicó que existen diferentes organizaciones que realizan proyectos con frutales en el área andina (PROCIANDINO, PROCITROPICO, TROPISUR, etc.) y que no necesariamente existe comunicación entre ellos.

Alain Pinon señaló que no existe comunicación entre los investigadores, y que cada quien trabaja por sí solo. Recomienda la elaboración de megaproyectos, definiendo claramente el trabajo que corresponde a cada investigador, con el fin de conseguir financiamiento internacional.

Conclusiones de la mesa redonda

- Identificar los problemas y priorizarlos.
- La potencialidad de la biotecnología en la solución de algunos problemas en la producción de frutales es indudable.
- Apoyar, promover y ejecutar acciones de comunicación e informática entre los investigadores locales, regionales y de la subregión. Existen problemas de comunicación que pueden ser resueltos mediante la formación de directorios y enlaces entre las redes de informática.
- Crear proyectos interdisciplinarios tendientes a resolver los problemas prioritarios de

la región, apoyados en la investigación básica.

- Creación de centros de investigación nacionales interrelacionados, conectados a la realidad del país.
- Enfoque comercial: aplicabilidad de los conocimientos generados a corto, mediano y largo plazo.

Fomentar entre los gobiernos el apoyo real y efectivo para desarrollar diferentes programas a nivel nacional y de la región andina. PROCIANDINO debe liderar esta campaña.

- Favorecer el intercambio de los diferentes profesionales interdisciplinarios con conocimiento y experiencia en frutales, en los cinco países de la subregión.

Participantes

Nombre	Dirección	Área de trabajo
Josefina Páez de Caséres	Fac. de Agron. Instituto de Agron. Lab. de Cultivo de Tejidos U.C.V. Venezuela.	Propagación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de plantas de interés económico. Conservación de Germoplasma <i>in vitro</i> .
Ladislao Vallejos Camacho	IBTA-Programa Frutales Caja Postal 3299. Telef. 25118. Calle Colombia E-0340. Cbba-Bolivia.	Investigación en subprograma Hortalizas.
Carmen L. Villarruel V.	IBTA-PROINPA C.P. 4285 Telef: 49013-49506 FAX: (591) (42) 45708 Cochabamba-Bolivia	Limpieza viral y micropropagación de raíces y tubérculos andinos.
Laura Muñoz E.	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. Panamericana Sur, Kilómetro 17 Casilla 17-01-340 Telef: 690-691/2/3/4. FAX: 690-691 Quito-Ecuador	Conservación <i>in vitro</i> de tubérculos andinos.
Norca Mogollón	Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Decanato de Agronomía Post-grado de Horticultura. Núcleo Tarabana. Cabudare. Edo. Lara Telefax: (051) 610355	Guayaba y Ornamentales: <i>Gorbera alstroemeria</i> , <i>Gloxinia catleya</i>
Mauro M. Quiñones A.	Pablo Bermúdez No. 179 Lima-1 Telef: 335103	Agrobiotecnología Cultivo de Tejidos: en Frutales.
Carlos Castillo Corbella	CICH-KM-Huaral Km. 5-6 Carretera Chancay-Huaral	Biotecnología, cultivo de tejidos en en frutales piña, banano, lucomo, fresa.
Raúl Salazar Castro Consuelo Jaramillo de G.	Apdo. Aéreo 233, ICA-CORPOICA Palmira - Colombia.	Programa Frutales
Alain Pinon	A-A 34565- Cali	CIRAD-FLhor-Programa Piña Asesor asociado Proyecto - Frutícola Proceandino
Zenaida Viloria V.	Universidad del Zulia Facultad de Agronomía Telef. 061-8672518	Micropropagación de guayabo, vid y guanábana.
Grigna J. Piña D.	Centro de Desarrollo Vitícola Tropical Km 32 Vía El Mojan Gerencia Industrial CORPOZULIA Telef. 061-921536 Maracaibo - Zulia.	Micropropagación de lechosa y banano.

***Curso internacional
de certificación
de cítricos***

Informe

**Maracay, Venezuela
6 al 10 de noviembre de 1995**

Patrocinadores: Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas - Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria para la Subregión Andina (IICA-PROCIANDINO) Red Andina de Frutiorticultura (FRUTHEX) Red Interamericana de Cítricos (RIAC-FAO) CIRAD-FHLOR, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Fundación para la Ciencia y Tecnología del Estado Aragua y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CINICIT)

Coordinadores: Lic. Ariadne Vegas y Efraín Salazar Departamento de Biotecnología, CENIAP; Ing. Ezequiel Rangel, Departamento de Protección Vegetal, CENIAP, Dr. Luis Avilán R., Coordinador Nacional de la Red Fruticultura de PROCIANDINO.

Sede: Instituto de Investigaciones Agronómicas, CENIAP, área Universitaria, El Limón, Apdo 4653, Maracay 2102, Venezuela.

Justificación: las explotaciones comerciales de cítricos en el área andina y el caribe presentan una serie de problemas de tipo fitosanitario y de manejo que sólo pueden solventarse con la implantación de programas de certificación. Tomando en cuenta que algunos países de la región, entre ellos, México, Cuba, Colombia y Venezuela, poseen experiencia en la certificación de árboles cítricos, este curso pretendió la difusión de estos conocimientos.

De este manera se desea contribuir al mejoramiento y desarrollo de las explotaciones de

cítricos de la región, sobre la base de la obtención de materiales más productivos y/o adaptados a las condiciones de cultivo. El consecuente aumento de la productividad y disminución de los costos de producción traerá beneficios socioeconómicos importantes para los productores e incentivará la siembra. Un buen manejo de este cultivo permanente posibilitará un mejor aprovechamiento del ambiente sin deteriorarlo.

Objetivos:

- Capacitar y actualizar a los profesionales de la subregión andina y el Caribe en la producción de árboles certificados de cítricos, haciendo uso de las metodologías más avanzadas.
- Intercambiar y aprender experiencias de los países participantes que han implantado o están implantando programas de certificación de cítricos.
- Fomentar la creación de proyectos o grupos de trabajo, en la región, en el área de la certificación.

Participantes: el curso contó con la participación de cuatro personas procedentes de Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador, 5 de instituciones Venezolanas; una de Chile, una de Uruguay y una de México; ponentes invitados de México, Martinica, Cuba y Venezuela.

Metodología: El curso constó de conferencias por parte de investigadores en las áreas de biotecnología, protección vegetal y producción de árboles de México, Martinica, Cuba y Venezuela. Esta parte teórica se realizó desde el 8 hasta el 12 en horas de la mañana. A

partir de las 2 p.m. se iniciaron las prácticas de laboratorio y campo, involucrando las técnicas de micropropagación, detección de patógenos de patógenos (virus y viroides) mediante pruebas biológicas, serológicas y microscopía electrónica. Igualmente se realizó una mesa redonda para discernir sobre las limitaciones y posibilidades de aplicación de las metodologías aprendidas en el curso y la implantación de los programas de certificación en cada país. Se realizó una visita a fincas de la zona.

A continuación, por considerarlo de interés, se incluye el contenido de las diferentes prácticas realizados durante el curso.

Práctica No. 1A: la microinjertación de los cítricos.

Instructora: Lic. M. Sc. Ariadne Vegas.

La técnica consiste en la injertación de ápices de árboles infectados en portainjertos provenientes de semilla, en las condiciones estériles en un medio nutritivo, es una variante del cultivo de ápices.

En 1976, Murashige *et al.* demuestran que el viroide de la exocortis y el stubborn pueden ser eliminados a través de la microinjertación. Un año más tarde, Navarro L., Roistacher C. y Murashige T perfeccionan la técnica evaluando otras variables y compueban su eficiencia en la eliminación de varios patógenos.

La microinjertación es una técnica que ha demostrado ser efectiva para sanear cultivares de los virus: Tristeza, Seedling yellow, Psorosis A y B, concave gun, infectious variegations, exocortis, stubborn y xiloporosis. Las plantas resultantes no muestran juvenilidad y la disponibilidad de yemas es posible en menos de un año; tienen características idénticas a la planta madre, con la excepción que están "li-

bres de virus" y probablemente su producción será mayor.

Existe la necesidad de usar yemas libres de virus ya que aún cuando éstas se injertan en patrones tolerantes a la enfermedad, si la copa es susceptible, los síntomas se van a manifestar por encima de la línea de injertación.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones, este método ha sido seleccionado para la producción de yemas «libres de virus en muchos países, entre ellos: España, Brasil, USA, Cuba y Venezuela.

Selección de plantas madres

Representantes de las variedades más comerciales de naranja (valencia y california grapefruit, mandarinas, limas y otras, fieles al tipo, con buenas características agronómicas (buena producción y calidad del fruto, vigor, bien formadas y libre de quimeras).

Las plantas seleccionadas se injertan sobre patrones resistentes a tristeza, y con ellos se funda el huerto de plantas madres, en un área cercana al laboratorio donde se realizará la microinjertación.

Proceso de microinjertación

1. Producción del patrón

- Eliminación de las cubiertas de la semilla.
- Esterilización: 10 minutos en solución de hipoclorito de sodio al 0,58% + tween 20.
- Tres lavados en agua destilada estéril.
- Medio cultivo: sales minerales MgS sólido.
- Siembra: una semilla por tubo.
- Germinación: oscuridad, 27 °C, 2 semanas.

- Patrón: Citrange Troyer, Citrange Carrizo, Citrumelo Swingle = Hojas trifoliadas. Se puede usar cualquier patrón.
- Preparación: decapitación 1 a 1,5 cm del epicotilo.

Recorte de las raíces.

Eliminación de cotiledones y yemas axilares.

Incisión en T invertida.

2. Extracción del injerto

- Brotes en crecimiento activo *in vivo* o *in vitro*. 1 cm aproximadamente.
- Esterilización: 5 minutos en solución al 25% de hipoclorito de sodio + tween 20. Tres lavadas con agua destilada estéril (en el caso del brote *in vivo*).
- Con puntas de hojillas de afeitar, bajo microscopio estereoscópico se extrae el meristemo (meristemo apical + 2 primordios foliares: 0,1 - 0,15 mm) y se coloca en la superficie de la T invertida del patrón.

3. Cultivo de la planta injertada

- Cultivada en un medio líquido MgS, sujetadas por puente de papel de filtro.
- Temperatura: 27 °C.
- Luz: 16 horas, iluminación: 1 000 lux.
- 3 - 5 semanas: listas para trasplante.
- Trasplante: potes con mezcla esterilizada, adecuada para el crecimiento de plantas cítricas.
- Cubierta con bolsas de polietileno (cámara húmeda) por dos o tres semanas.

- Reinjerto: en vez de sembrar la planta directamente a tierra, se puede cortar su extremo inferior en forma de bisel e injertar una T invertida en un patrón de vivero. Se coloca en una cámara húmeda por dos o tres semanas.

Práctica No. 1B: determinación de isoenzimas en cítricos.

Instructores: Ing. M. Sc. Efrain Salazar e Ing. Julio Marrufo.

Material vegetal

Gogorcena *et. al.* (1989) utilizó cuatro tejidos de mandarinas: hojas, corteza del fruto y/o tegumentos y cotiledones, los cuales permitieron la identificación genética de los cultivares. En esta práctica se tomarán hojas como tejidos fuentes de proteínas e isoenzimas, ya que es un material fácil de obtener durante todo el año, sin limitaciones de número o calidad, dada la condición tropical siempre verde de los cítricos.

Se colectaron hojas en plena madurez fisiológica, provenientes de árboles presentes en el bloque de fundación de cítricos del CENIAP.

Extracción de las muestras

Las muestras se maceran con buffer dithiothreitol 10 mM ($C_4H_{10}O_2S_2$) en una proporción 1:2, de tejido (lámina de hoja): buffer. Se centrifuga el extracto a 3000 rpm durante tres minutos, a 4 °C, a fin de eliminar los restos celulares.

Preparación de muestras de corridas

Se toman 200 ul del sobrenadante y se transfieren a tubos de microcentrifuga Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. A este volumen de extracto se le agregan 5 ul de azul de bromo-

fenol (colorante) 50 ul de glicerol al 85% y 15 ul de dietilformamina. De esta manera, las muestras se utilizan directamente para realizar la corrida electroforética y/o almacenan a -80% °C.

Preparación del gel y selección del buffer

Gel	Separador 12%
4,00 ml	Poliacrilamina (%T =30 y %C = 3)
1,67 ml	Buffer Tris - HCl 1,5M y pH = 8,8
1,17 ml	Glicerol 85%
3,79 ml	Agua destilada y desionizada
15,00 ul	TEMED
30,00 ul	Persulfato de amonio

Gel	Separador 8%
2,50 ml	Poliacrilamina (%T =30 y %C = 3)
3,00 ml	Buffer Tris - HCl 1,5M y pH = 8,8
1,50 ml	Glicerol 85%
3,00 ml	Agua destilada y desionizada
15,00 ul	TEMED
30,00 ul	Persulfato de amonio

Gel	Separador 6%
1,00 ml	Poliacrilamina (%T =30 y %C = 3)
0,835ml	Buffer Tris - HCl 1,5M y pH = 8,8
3,215 ml	Agua destilada y desionizada
15,00 ul	TEMED
30,00 ul	Persulfato de amonio

Formulación de los tampones utilizados en la preparación de los geles (PAGE)

BUFFER TRIS-HCl (1,5M pH = 8,8)
27,3 g de tris base disueltos en 150 ml de agua destilada y desionizada ajustando a pH 8,8 con NaOH 1 Molar.

BUFFER TRIS-HCl (0,5M pH = 6,8)
11,82 g de tris -HCl disueltos en 150 ml de agua destilada y desionizada ajustando pH a 6,8 con NaOH 1 Molar

Condiciones de la corrida

Todas las corridas de PAGE se realizan en un aparato marca Sigma Techware modelo ES889 para geles verticales, y como fuente de poder un aparato Bio-Rap de 250 vatios de potencial. El volumen utilizado de cada muestra por carril fue de 10 ul. bufer tris-glicina pH 8,3 se usó como sistema de corrida. Se probaron varios diferenciales de potenciales de 50 y 100 V hasta llegar al gel separador, 100 y 150 V hasta que el colorante llegue al borde inferior del gel.

Tinción

Peroxidasa (PRX) I. U. B. Donor:hydrogen peroxide oxidoreductase

1 Molar Na ₂ PO ₄	35 ml
Metanol	15 ml
Dianisidina	25 mg
H ₂ O ₂ al 3%	0,3 ml

Esterasa (EST)

100 mM Na-phosphate, pH 6,0	50 ml
α -Naphthyl acetate	25 mg
β -Naphthyl acetate	25 mg
Fast Blue RR Salt	50 mg

Práctica No. 2A: Inclusiones citoplasmáticas para el diagnóstico de CTV.

Instructora: Dra. Rafaela Cuello de Uzcátegui.

Inclusiones virales

Los virus de plantas son capaces de causar enfermedades en la gran mayoría de las especies vegetales. Cuando las enfermedades son sistémicas, los virus pueden afectar a gran parte de los tejidos. El estudio de los

tejidos infectados ha orinado en el transcurso del tiempo, una serie de observaciones de los cambios citopatológicos y de las estructuras intracelulares, diferentes a las observadas en las plantas sanas.

Las inclusiones virales son estructuras anormales intracelulares que resultan de una infección viral en las plantas.

Desde hace tiempo se conoce que los virus de plantas pueden inducir inclusiones virales. Al principio se conocían dos tipos de inclusiones, uno de estructuras cristalinas o paracristalinas en forma de placas hexagonales, agujas o ahusadas y otro tipo de inclusiones amorfas llamadas cuerpos vacuolados, cuerpos ameboides y frecuentemente conocidas como cuerpos X. (Bawden, 1964; Singh y Hildebrandt, 1966; Warmke y Edwarson, 1966).

En estudios y observaciones más recientes se enfatizó la importancia de las inclusiones virales debido al papel que juegan en el diagnóstico de las enfermedades (Christie, 1967; Edwarson y Christie, 1978) El Comité Internacional de Taxonomía de Virus, una vez realizados los estudios correspondientes, determinó que existe una estrecha relación entre los tipos de inclusiones y los grupos taxonómicos virales. Es decir, la gran mayoría de los miembros de un grupo viral induce un tipo de inclusión, por ejemplo, los cuerpos bandeados son causados por Potexvirus, las placas apiladas de los Tobamovirus, las inclusiones cilíndricas de los Potyvirus y los anillos fibrilares de los Geminivirus (Edwarson, 1974; Martelli and Russo, 1977; Christie y Edwarson, 1977; Edwarson y Christie, 1978).

La técnica de observación de las inclusiones virales surge como una herramienta práctica para corroborar una infección viral, pudiendo ser ésta implantada de una forma sencilla en los laboratorios o en sitios apartados que no cuenten con equipos específicos para virología. La observación de los tejidos enfermos,

previamente teñidos mediante un microscopio de luz, permite ver directamente las inclusiones virales ya que éstas son de un tamaño apreciable, difieren en apariencia de los demás organelos y se tiñen con colorantes específicos.

Los tejidos epidermales, generalmente contienen muchas inclusiones virales para la gran mayoría de los grupos. Algunas inclusiones inducidas por ciertos virus se encuentran en tejidos del mesófilo y otras como los inducidos por Closterovirus, Geminivirus y Luteovirus suelen estar asociados a los tejidos conductores. Estas asociaciones son muy importantes porque las hace más específicas para el diagnóstico.

Bibliografía

- BAWDE, F. C. 1964. Plant virus and virus diseases. 4th. ed. Ronald Press Co. N.Y., USA.
- CHRISTHIE, R. G. 1967. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusions in epidermal strips. *Virology* 31:267-268.
- CHRISTHIE, R. G.; EDWARSON, J. R. 1977. Light and Electron microscopy of plant virus inclusions. Experiment Station. Monograph Series. Number 9. University of Florida, Gainesville, 155 p.
- EDWARSON, J. R. 1974. Some properties of the potato virus Y-group. Florida Agricultural Experiment Station Monograph Series Number 4: 398 p.
- EDWARSON, J. R.; CHRISTHIE, R. G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis *Ann. Rev. Phytopath.* 16: 31 -35.

MARTELLI, G. P.;RUSSO, M. 1997. Plant virus inclusion bodies. Adv. in Virus Resech. 21: 175-266.

SINGH, M.;HILDEBRANT. 1966. Movements of tabacco mosaic virus inclusions within tobacco callus cells. Virology 30: 134-142.

STEERE, R. L.;WILLIAMS, R. C. 1953. Identification of cristalline inclusion bodies extracted from plan cells infected with tobacco mosaic virus. Amer. J. Bot. 40:81-84.

WARMKE, H. E.; EDWARSON, J. R. 1966. Electron microscopy of cristalline inclusions of tobacco mosaic virus in leaf tissue. 30:45-47.

Desarrollo de la práctica

Reactivos

- 500 ml de Triton X-100 al 5% en agua.
- Un litro de etanol técnico al 95%.
- 100 ml de Eurapal vert o bálsamo de Canadá
- 500 ml Ethylene glycolmonomethyl ether (2-methoxyethanol), methyl = Cellosolve Sigma # E5378).
- Calcomine orange 2RS (Aldrich Chemical Co. # 27, 752-5).
- Luxol-Brilliant Green BL (Aldrich Chemical Co. # 27, 726-6).
- Azufre A (Aldrich Chemical Co. # 86, 104-9).
- Fosfato de sodio dibásico (500 ml Na_2HPO_4 0,2M).
- 500 ml de 2-methoxyethyl acetato.
- Agua destilada.

- Aceite de inmersión.
- Xylol técnico.

Materiales

- Pinzas de punta fina (tipo relojero) Dumont # 5.
- Bisturí, hojillas doble filo desechables, hojillas gruesas de un solo filo.
- Vidrios de reloj tipo syracuse.
- Cajas de petri (vidrio) de 8 cm de diámetro.
- Pipetas Pasteur tallo corto.
- Gomitas para gotero con las pipetas Pasteur.
- Hisopos.
- Aplicadores de madera sin algodón.
- Lija de agua # 600.
- Anime delgado.
- Porta objetos de vidrio.
- Cubreobjetos.
- Beakers, fiolas pequeñas, balones de 100, 500 y 1000 ml, embudos, cilindros graduados de 100 ml.
- Papel para limpiar lentes, papel de filtro, papel absorbente, toallin.
- Microscopio de luz con magnificación de 1000x o mayor.

Preparación del colorante

Previamente se prepara el colorante, de la manera siguiente: se pesa 0,1 g de azufre A

y se disuelve en 100 ml de 2-methoxyethanol, utilizando magneto, y luego se filtra con papel filtro whatman # 4, se guarda tapado en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Procedimiento para teñir

La solución para el teñido de azufre A, se prepara mezclando en un vidrio de reloj 9 gotas de azufre A (0,1% de methoxyethanol) y una gota de fosfato dibásico (Na_2HPO_4) 0,2M, se mezcla bien y se utiliza inmediatamente, se emplea sólo una vez.

Las partículas de los Closterovirus se acumulan en grandes masas en el floema y en el parénquima floemático. Para el caso del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) se toma el pecíolo de las plantas afectadas, se necesita hacer cortes del tallo, para lo cual se debe exponer el mesófilo y otros tejidos profundos como son los conductores. Para esto se coloca el pecíolo entre dos animes, el corte debe hacerse en forma longitudinal al tallo, se presiona firmemente y se corta con un bisturí o con una hojilla a mano suelta, hasta obtener un corte fino, se clarifica con 2-methoxyethanol (10-15 minutos) se colorea con azufre A (5-10 minutos) se decolora con alcohol 95% durante pocos segundos, se monta en Euparal y se cubre con un portaobjeto, finalmente se observa al microscopio. Las inclusiones se tiñen de rojo violeta.

Práctica No. 2B: Prueba de ELISA

Protocolo

1. Colocar las muestras maceradas en coating buffer (carbonato bicarbonato pH 9,6) Centrifugar en Eppendorf # 2. Colocar 100 ul/pozo.

Se guarda en cámara húmeda en la nevera a 4 °C toda la noche. Se lava tres veces con buffer de lavado PBS-T.

2. Se bloquea con BSA 1%, preparar en el momento, dejar por una hora en la estufa 37 °C 200 ul/pozo.

Se lava tres veces con PBS-T.

3. Se colocan los anticuerpos diluidos según esquema (1:500, 1:1000, y 1:2000) en PBS. Se dejan por una hora en estufa 37 °C o hasta el día siguiente en la nevera a 4 °C 100 ul/pozo.

Se lava tres veces con PBS-T.

4. Se coloca el anticonejo-fosfatasa alcalina, diluida 1:1000 en PBS.

Se deja por una hora en la estufa a 37 °C.

Lavar cinco veces con PBS-T.

5. Se disuelve el sustrato fosfatasa-alcalina, una pastilla/cada 5 ml 100 ul/pozo por 45' a 60'.

Añadir 50 ul de NaOH 3M en oscuridad y temperatura ambiente.

Práctica No. 2C: Microscopía electrónica con serología.

Serologically specific electron microscopy (SSEM)

DERRICK, K. S. En serological methods. A laboratory manual. Hampton, Ball, De Boer eds APS press.

Soluciones

- | | | |
|------------------------|--------|--------|
| - Buffer Tris-HCl | 0,05 M | pH 7,2 |
| - Buffer TSS: Tris-HCl | 0,05 M | pH 8,4 |
| Sacarosa | 0,4 M | |
| NaCl | 0,15 M | |

Procedimiento

1. La rejilla se coloca sobre las gotas de AS-CTV. Se colocan en caja de Petri con papel húmedo por 30´.
2. Lavar las rejillas con Buffer Tris-HCl. 10 gotas por cada rejilla.
3. Se colocan sobre las gotas de las muestras con virus y se dejan en una caja de Petri, por una a cuatro horas.
4. Se lavan en tres gotas del Buffer TSS.
5. Se lava tocando una gota de agua 2´´.
6. Se colorea colocando la rejilla sobre una gota de Uranyl por dos minutos o de PTA por 3 minutos, se deja secar y se observa.

Práctica No. 2D: Purificación parcial del virus de la tristeza de los cítricos

Instructor: Ezequiel Rangel.

Extracción y precipitación: (Todo a 4 °C)

- Macerar 75 g de tejido en nitrógeno líquido
- Añadir buffer de extracción (B.E) en proporción 1:4 p/v. Homogenizar por 5 minutos en frío.
- Filtrar a través de gasa fina y centrifugar a 10 000 g x 10 minutos.
- Pelet recuperado en 5 vol. de B.E y centrifugado a 10 000 g x 10 minutos.
- Descartar pelet.
- Se mezclan sobrenadantes y se añade polietilenglicol 6000 al 5% p/v y 1% de Na Cl p/v (concentración final. Agitar por una hora.

- Centrifugar a 15 000 g x 30 minutos.
- Descartar sobrenadante y resuspender pelet en Buffer fosfato 0,05M y pH 8,0 (B.F.) a la mitad del volumen inicial + 5% de sacarosa. Añadir 0,5% de Tritón -100 y agitar durante 2 horas.

Concentración y purificación

- Clarificar a 5 000 g x 10 minutos y colocar sobrenadante sobre un colchón de 2% sacarosa en B.F.
- Centrifugar a 130 000 g x 2,5 horas.
- Recuperar pelet y resuspender en 2 ml de B-Tris-HCl a 0,05M y pH 8,0.
- Colocar extracto sobre gradiente discontinuo de sulfato de Cesio (Cs_2SO_4) en B-Tris-HCl 0,05M y pH 8,0.
- Centrifugar a 200 000 g x 18 horas.
- Fraccionar gradiente en alícuotas de 0,5-1,0 ml y se evalúan al MET, o por inmunoensayo.
- Las fracciones con virus y limpias se mezclan y se concentran a 100 000 g x una hora en 1 ml de B-Tris-HCl 0,01M y pH 8,0.
- Se estima concentración de núcleo-proteína por espectrometría U.V y se dializa contra B. fosfato 0,01M y pH 7,5. Se almacena liofilizado o a -20 °C hasta su uso.

Buffer de extracción

Tris-HCl a 0.5M y pH 8,2 +0,2 mercapto-etanol + 0,01M Na-DIECA (dietil ditiocarbamato de sodio)

Buffer fosfato pH 8,2

Na_2HPO_4 0,1M + KH_2PO_4 0,1M en proporción 9,75:0,25.

Práctica No. 3: extracción de RNA viroidal similes a partir de la corteza de cítricos (también asociados al mosaico latente del duraznero)

Instructor: Ing. M. Sc. Francisco Ochoa.

- Previsiones

Un día antes se deben preparar todas las soluciones amortiguadoras y otras. También deben esterilizarse los implementos y vidriería, por ejemplo: morteros, cilindros graduados, vasos de precipitado, tubos plásticos y de vidrio para la centrifugación (estos últimos en número que triplique el número de muestras que se trabajarán) No olvidar esterilizar H_2O bidestilada.

- STE 10X (extracción)

Tris 50 mM 60,5 g/l (Trisma base Sigma)

NaCl 100 mM 58,4 g/l

Na_2 EDTA 1 mM 3,7 g/l (Triple III Merck)

Agregar agua destilada estéril hasta alcanzar el volumen de un litro, nivelar el pH a 7,2 con HCl concentrado. Esterilizar en autoclave.

- TRIS 0,2M 24,2 g/l (pH 8,9) 500 ml son suficientes (Trisma base Sigma + HCl)

- Na_2 EDTA 0,1M 37,2 g/l 100 ml son suficientes (Triplex III Merck).

- SDS 5% 5/100ml (pH 7,2) con HCl (para disolver se puede calentar).

- Fenol saturado con agua

Calentar la botella a 68 °C en una cubeta termoregurable (baño de María) Llevar a volumen con igual cantidad de agua destilada (250 ml) Agregar 8-Hidroxyquimoline (0,1% por cada gramo de fenol) Agitar y dejar a temperatura ambiente. Eliminar el agua y medir el pH, llevarlo a 7 con NaOH 1M.

- Acetato de sodio 3M pH 5,5 (100 ml)

PM = 82,03; disolver 24,609 g de acetato de sodio en 100 ml de agua destilada estéril. Ajustar pH a 5,5 con ácido acético glacial.

- STE 1X con 35% etanol

100 ml STE 10X *Agua bidestilada estéril

350 ml de etanol 100* (por litro de de agua)

Agregar 550 ml de agua destilada estéril

- TBE 10X (Solución madre) (Electroforesis) (para la muestra y para el gel)

		1 litro	2 litros
Trisma base	890 mM	107, 8 g	215,6 g
H_3BO_3 (ácido bórico)	890 mM	55,0 g	110,0 g
EDTA (Triple III)*	30 mM	11,16 g	12,33 g

Agregar agua destilada, debe alcanzar pH 8,5 (no indispensable) llevar hasta un litro, esterilizar. *Marca Merck con sodio ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) Para utilizarlo en el equipo de electroforesis, se diluye el TBE 1:1= (aproximadamente 1X) 2,5 litros en el envase grande. 0,5 litros en la de arriba.

- Solución de acetato de sodio (Extracc. plantas herbáceas)

CH₃COONa (Natrínmacelato) 0,1M 0,8 g
EDTA (Triple III Merck) 1 M 0,03 g

Agregar agua hasta 100 ml, esterilizar.

- Solución de cloruro de litio (Extracc. plantas herbáceas)

LiCl 10M 42,4 g (solución madre)

Agregar agua destilada hasta alcanzar un volumen de 100 ml. Esterilizar y conservar en Freezer.

La solución se usa en el protocolo a una concentración 4M.

- Xylencianol 0,3% en 60 ml de glicerol, llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar. (0,3 g + 60 ml llevar a volumen).
- Bromofenol 0,3% en 60 ml de glicerol, llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar. (0,3 g + 60 ml llevar a volumen).

Nota: 1X o mX indica el número de pesos moleculares diluidos en un litro . Por ejemplo: 10 X = al peso molecular en 100 ml o bien a 10 pesos moleculares en un litro.

- Extracción del material vegetal

- * Macerar 20 g de tejido de corteza congelada en morteros con nitrógeno líquido. Homogenizar con:

16 ml Tris-CHL 0,2 M pH 8,9

4 ml NaEDTA 0,1 M pH 7.0

4 ml SDS 5%

80 ml fenol saturado con agua*

50 ul 2 -Mercaptoetanol*

También se puede hacer por mitad, 10 g de muestra, si se dispone de poco material y / o morteros pequeños.

- * Manipular en campana y agregar preferiblemente al final.
- * Agitar vigorosamente durante 30 minutos, en frío 4-6 °C.
- * Centrifugar a 6000 g (7 200 rpm, Berckman J2-21M /E, Rotor JA-18X98 mm) durante 15' a 4 °C.
- * Recuperar el sobrenadante, medir el volumen y agregar la mitad (1/2) del volumen obtenido pero de fenol saturado con agua, agitar levemente y mezclar.
- * Centrifugar a 6000 g (7 200 rpm) por 15' a 4 °C.
- * Recuperar el sobrenadante y agregar: 4 ml STE 10X+14 ml Etanol 100° y llevar el volumen a 40 ml con agua destilada estéril.
- * Colocar 2,5 g de celulosa CF-11 en tubos para centrifuga y vaciar allí el sobrenadante (+STE + etanol + agua).
- * Agitar a temperatura ambiente por una hora o toda la noche.

Al día siguiente.....

- * Centrifugar a 1000 g (3000 rpm) por 5' a 20 °C.
- * Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 60 ml de STE 1X con 35% de etanol.
- * Centrifugar nuevamente (igual a la anterior).
- * Lavar dos veces con otros 60 ml + 60 ml (129 ml) del mismo buffer (se transfiere

dentro de la columna con el último lavado).

- * Transferir dentro de la columna con "Miracloth" (No. catálogo 475855, quids filtration material for gelatinous grindates) se debe recortar un anillo con la misma área del interior de la jeringa que servirá como columna (20 ml) y debe esterilizarse siempre.
- * Eluir los ácidos nucleicos con tres lavados de 6,5 ml de STE 1X (sin etanol) recogiendo cada lavado en tubos de diferentes de 25 o 30 ml de capacidad (Corex No. 8446/25 ml).
- * Agregar 650 ul por tubo de Corex de acetato de sodio 3M y 16 ml de etano absoluto por tubo Corex.
- * Dejar toda la noche a -20 °C o a -70 °C durante 15 minutos.

-
- * Cetrifugar a 8 000 g (8 500 rpm) por 30 minutos.
 - * Recojer el pellet y suspenderlo en 1,5 ml (1+ 0,5)** de etanol a 70% frío.

** Observación: se lavan , primero los tu-bos con 1 ml, luego se reposan con 1/ 2 ml restante de la misma forma.

- * Se colocan las muestras en tubos "Eppendorf" y se colocan a -70 °C por 15 minutos o -20 °C toda la noche.
- * Centrifugar a 10 000 rpm por 30 minutos a 4 °C (en microcentrifuga).
- * Eliminar el sobrenadante y secar al vacio por más o menos 20 minutos.
- * Resuspender el pellet en 150 ul de agua estéril (100 ul por cada 10 g de tejido vegetal).

* Conservar a -20 °C.

Observación: la resuspensión se puede hacer al final de la extracción o bien al día siguiente de la electrofóresis.

Electrofóresis

Preparación de las muestras para la electrofóresis (ácido nucleicos extraídos y parcialmente purificados).

- Sacarlos del congelador a -20 °C.
- Dejar disolver en 100 ul de H₂O estéril/también se puede disolver en 150 ul al pellet obtenido o al residuo que se desea dejar.
- Golpe de microcetrifuga.
- Paralelamente preparar nuevos "Eppendorf" con: (etiquetar muestras).

Peine 6 mm

5 ul TBE 10X
5 ul Xylencianol
5 ul Bromofenol
35 ul muestra

Peine pequeño

3 ul TBE 10X
3 ul Xylencianol
3 ul Bromofenol
21 ul muestra

- Los 5 ul de cada reactivo se colocan en las paredes bajas del "Eppendorf" separados y se mezclan al final con la muestra proveniente del "Eppendorf".

Electrofóresis en geles de poliacrilamida al 5% (I Dirección)

Preparación del gel (50 cc):

- Pesar Methylene bisacrilamine 0,11 g
- Agregar Acrilamine hasta 2,5 g
- Agregar TBE 10X 5,00 ml
- Disolver Metilenbisacrilamide y Acrilamide.

- Agregar H₂O estéril hasta volumen de 49,5 ml.
- Para polimerizar, agregar:
 - * Amonio persulfato (AMPS): preparado antes de su uso 0,5 ml. 0,5 g en 5 ml de agua estéril (10%)
 - * Tetramethyletilendiamina (TEMED): 50 ul.
- Vaciar rápidamente, pero con cuidado, entre los vidrios ya ensamblados, se esperan 10 diez minutos para polimerizar.
- Colocar el o los geles dentro del recipiente para la electrofóresis y llenar con TBE 1X hasta un centímetro de la base del gel, colocar la tapa superior y llenar con TBE 1X. (2,5 litros en el recipiente y 0,5 litro arriba para la Protean II Biorad o Simil (gel 16 cm x 16 cm x 1,5 mm).
- Iniciar una pre-electrofóresis. 10 mA x 30 minutos (43 V) para cada gel.
- Cargar las muestras (10 - 50 ul por pozo)
- 10 mA por 15 minutos
- 40 mA hasta que los marcadores llegen aproximadamente a 1 cm de la base del gel aprox. x 2 horas.

También:

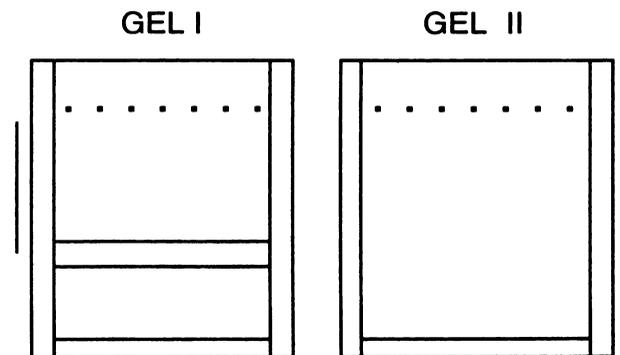
10'	10 mA	1,00 h + 50 minutos
5'	20 mA	
1h	40 mA	
30'	40 mA	
20'	40 mA	

Observación:

1. A este nivel se puede colorear el gel con AgNO₃, si se pretende evidenciar bandas de ARN-viroides o con bromuro de etilo si se desea recuperar los ARN infectivos.
2. No colorear el gel si se continua con una electrofóresis bidireccional o bidimensional.

Transferencia del gel

Cuando termina la primera fase de la electrofóresis (Gel 1) se recorta la banda azul claro y se descarta el resto. La banda de gel se transfiere sobre otra lámina de vidrio estéril, colocándola en el fondo (hacia la base) Para desprender y colocar la banda se puede colocar una película de agua estéril con una micropipeta. Luego se coloca la otra lámina de vidrio encima, se adsorbe el exceso de agua con papel absorbente. Posteriormente se vierte el Gel II y se invierten los polos eléctricos (el vidrio más corto adelante)



Electrofóresis en gel de poliacrilamina al 7% y urea 8M (II dirección - Gel denaturante = d PAGE)

Preparación del Gel (50 cc):

- Pesar Methylene bisacrilamide 0,15 g
- Agregar Acrilamide hasta 3,50 g

- Agregar TBE 10X 5,00 ml base de otro juego de vidrios estériles, éstos se cierran y se llena con el gel que contiene urea.
- Pesar y agregar urea 24,00 g
- * Agregar agua estéril 20,00 ml (inicialmente agregar 15 ml, luego los 5 restantes y después que la urea ya esté en solución.
 - Esperar a que polimerize (Aprox. 60 minutos) en frío.
 - Iniciar la electrofóresis (invirtiendo los electrodos en modo que la corrida viaje del polo positivo a aquel negativo a 37 mA por 8 horas.
- * Llevar a volumen con agua estéril (49 ml)
- * Para polimerizar, agregar:
 1. Amonio persulfato (AMPS): preparado antes de su uso 0,5 ml. 0,5 g en 5 ml de agua estéril (10%)
 2. Tetramethyletilendiamina (TEMED): 50 ul.
 - Colorear el gel con AgNO_3 o bromuro de etilo.
- Una vez cortada horizontalmente la banda del gel de la l dirección y transferida a la

FLORES, R and HACER, G. 1988. Isolation of viroid-like RNA asociated with peach latent mosaic disease. Acta Horticulturae 235: 325-332.

También se aplica en el caso de viroides de hojas de durazno y melocotón (PLMVd) Peach Laten Mosaic Viroid.

Coloración con nitrato de plata (silver stain) para ácidos nucleicos después de electrofóresis en gel de acrilamida

	Solución/reactivos	Volumen	Tiempo
1.	100 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Etanol) 95-11% 20 ml CH_3COOH (ácido acético glacial) 80 ml agua estéril	200 ml	60 min o toda la noche
2.	20 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Etanol) 95-100% 2 ml CH_3COOH (ácido acético glacial) 178 ml agua estéril	200 ml.	60 minutos.
3.	0,41 g AgNO_3 (12 mM). 200 ml de agua	200 ml	60 minutos
4.	2 o 3 lavados rápidos con agua destilada		
5.	0,5 ml HCHO (Formaldehido 28%) 8,5 g KOH (disolver primero el KOH en aprox. 190 ml de agua y el formaldehido al final)	200 ml	10-20 min./revelado hasta que las bandas de ácidos nucleicos estén bien visibles.
6.	10 ml CH_3COOH 190 ml de agua.	200 ml	STOP

Literatura entregada

- FLORES R.; GARRO, R.; CONEJERO, V.; CUÑAT, P. 1995. Purificación en gradiente de densidad de sulfato de cesio de las partículas nucleoproteínas asociadas a la tristeza de los cítricos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 15: 93 - 97.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. FAO/IBPGR. 1991 Technical guidelines for the Safe Movement of Citrus Germoplasm. E.A. FRISO AND M. M. TAHER (edc.):50 p.
- FUSAGRI. 19???. Situación actual de las cítricas sobre los nuevos patrones. *Noticias Agrícolas* XI:144-147.
- GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; GOLLNOW, B. 1991. Viroids in Australian Citrus. Relationship to Exorotis, Cachexia and Citrus Dwarfing. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:559-570.
- LEE, R.; GARNSEY, S.; BRLANSKY, R.; GOHEEN, A. 1997. A Purification Procedure for Enhancement for Citrus Tristeza Virus Yields and its Application to other Phloem - Limited Viruses. *Phytopathology*. 77:543-549.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of Shoot-tip Grafting *in vitro* for virus - free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100: 471 - 479.
- OCHOA, F.; TRUJILLO, G. 1994. Metodología sencilla para obtención de antisuero al virus de la tristeza de los cítricos. *Fitopatol. Venez.* 7:2 -5.
- OCHOA, F.; TRUJILLO, G. 19???. Selección de razas débiles del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) con fines de protección cruzada. *Anales de Botánica Agrícola*.
- OCHOA, F.; ROCHA, M.; LEE, R. 1994. Impacto del virus de la tristeza en la citricultura venezolana: cronología de eventos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 12: 97 - 105.
- OCHOA, F.; CARABALLO, O.; TRUJILLO, G.; MAYORAL, M.; LEE, R. Biological characterization and evaluation of cross protection potential of citrus tristeza virus isolates in Venezuela. Twelfth IOCV. Conference. 1-7.
- OCHOA, F.; MÉRIDA, T.; TRUJILLO, G. 1994. Alteraciones histológicas en pecíolos de limonero criollo (*Citrus aurantifolia*) inducidos por razas de la tristeza de los cítricos. *Fitopatol. Venez.* 7:22-26.
- ROISTACHER, C. N. 1993. Arguments for establishing a mandatory certification program for citrus, *Citrus Industry*. October. 8 p.
- ROISTACHER, C. N. 1977. Elimination for citrus pathogens in propagative budwood. I Budwood Selection, indexing and thermotherapy. *Proc. Ind. Soc. Citriculture* 3:965 - 972.
- ROCHA, M.; LEE, R.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.; OCHOA, F.; GARNSEY, S.; YOKOMI, R. 1995. Citrus tristeza virus and aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*. 437 - 445.
- ROCHA, M.; LEE, R. 1991. Serological technique for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological. Methods* 34: 311 - 331.
- SYMONS, R. 1991. The intriguing viroids and virosoids: what is their information content and how did they evolve? *Molecular Plant - Microbe Interactions* 4: 111 - 121

Directorio

Nombre y Apellidos	Procedencia	Dirección
Argenis José Asuaje Lozada	Productor (viverista)	Vivero La Trilla, Edo. Yaracuy Teléfs. 043-336860, Ofic. 054-751101. Venezuela.
Inés Peña Bargaza	Instituto de Investigaciones de Cítricos.	Av. 23 # 22816 E/222 c/243 Playa Ciudad Habana, Cuba. Teléf.: 218908, Fax: 53-7336794 E-Mail: IICITC CENIAI, CUBA.
Yonis A. Hernández	Facultad de Agronomía UCV	Av. Universidad, El Limón Instituto de Botánica Agrícola, UCV.
Ximena Besoain	Facultad de Agronomía Universidad Católica Valparaíso.	Casilla 4-D. Quillota, Chile Fundo La Palma S/No. Teléfs. 56-33-310524 Fax: 33-3132.
Olga Mas Camacho	Instituto de Investigaciones de Cítricos.	Av. 23 # 22816 E/222 c/243 La Coronela, Ciudad Habana, Cuba. Teléf. 53-7-218908, Fax: 53-7336794 E-Mail: IICITC CENIAI, CUBA.
Alvaro Caicedo Arana	CORPOICA	Centro de Investigaciones de Palmira Teléf.: 758161 Fax: 733687 Apartado Aéreo: 233.
Nicanor Cuba Cuevas	IBTA	2do. Crucero 1753, Correo Central La Paz, Bolivia Teléf.: 326572.
Rosa María Cabrera Pintado	INIA	Av. La Universidad s/n, La Molina Lima 12 Perú Teléf.: 51-14-351979 Fax: 5114-351979.
Cao Van Philippe	CIRAD-FLHOR	BP 153 97200 Fort de France Martinique Teléfs.: 596-719201 y 596-630724
Juan Vega Pérez	Unidad de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.	Centro Universitario "Victoria" CD. Vitoria Tamaulipas, México, Part: 3 Bravo Allende # 564 087000 CD Victoria, Tampas MX Teléfs.: 131-21738, 21738 y 7 27013.

/... continúa

Nombre y Apellidos	Procedencia	Dirección
Rafaela Cuello Uzcátegui	Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.	Carretera Panamericana km 11. Apdo, 21827 Caracas 1020 Venezuela Teléfs.: 044 632975 y 02 501 1188 Fax. (58) 2571 3164 - 571 3164.
Francisco M. Ochoa C.	Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica	Apdo. Postal 4579 Maracay 2101 Aragua, Venezuela. Teléf. 043 356849 Fax: 043 453242 - 455843 - 453242.
Ángel R. Rincón T.	Facultad de Ciencias Forestales, U. de los Andes.	Instituto de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Santa Rosa La Hechicera - Mérida - Venezuela Teléf.: 074-401536 Fax: 074 -401503.
Ibelises Pino	UCV	Facultad de Agronomía, Maracay, Aragua, Venezuela.
Alex Gozález V.	Asesor Particular	Urb. La Mulera, Calle 5 No. 229, Sector Los Samanes, Maracay, Aragua - Venezuela. Teléf.: 043 333821
Alfredo Fossali	Servicio de Protección Agrícola, Ministerio Agricultura y Ganadería	Millán 4703, Montevideo, Uruguay Teléf.: 398410 y Fax: 392828. DGSA - Roachasque APC. ORG.
Juan León F.	INIAP	Av. Amazonas y Eloy Al Tomo, Edif. MAG. 4to. Piso, Casilla 2600 Quito - Ecuador. Teléf.: 541-997 - 371 057 Fax: 00 593 (2) 502- 240
Fernando Centeno	CENIAP-IIA	Av. Universidad, vía El Limón, Zona Universitaria. Edif. No. 2 Maracay - Aragua - Venezuela.
Mario A. Rocha Peña	IIFAP	Campo Experimental General Terán Apdo. Postal 3, General Terán, Nuevo León 67400 México . Teléf.: 52 (8) 3766320 Fax: 52 (8) 3766320 y 52 (826) 70539. E mail: MROCHA@CCR.USI.UANL.MX.
Edmundo Monteverde	CENIAP. Instituto Investigaciones Agropecuarias	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101 Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.

Nombre y Apellidos	Procedencia	Dirección
Efraín Salazar	CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas Dpto. Biotecnología	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101. Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.
Ariadne Vegas	CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas Dpto. Biotecnología	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101 Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.
Julio Marrufo	CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas Dpto. Biotecnología	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101. Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.
Mario Cermeli	CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas Dpto. Biotecnología	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101. Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.
Ezequiel Rangel	CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas Dpto. Proctección Vegetal.	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101. Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.
José Ruiz	CENIAP. Instituto de Investigaciones Agronómicas Dpto. Sistema de Producción de Cultivos Regionales	Edif. No. 8, Área Universitaria El Limón Apdo. 4653A, Maracay 2101. Venezuela. Teléf.: 58-43-453075 y 452491 Fax: 58-43-471066 y 454320.

Edición: *Félix J. Chirinos y Elio A. Pérez S.*
Montaje: *Nury Castillo*
Fotolito: *Jesús Laguna*
Impresión: *Juan Salas*

Impreso en el Taller de Artes Gráfica del FONAIAP
Maracay, Venezuela. Abril de 1999
Tiraje: 300 ejemplares

