



INIA
Instituto Nacional
de Investigaciones
Agrícolas

Vol. 56, N° 4, 2006

Agronomía Tropical

Especial Red Bio, 2005

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS - VENEZUELA

AGRONOMÍA TROPICAL

Revista trimestral del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Venezuela, anteriormente FONAIAP.

AGRONOMÍA TROPICAL publica trabajos inéditos sobre resultados de investigación obtenidos en las ciencias agrícolas y sus diferentes disciplinas: mejoramiento agronómico, recursos fitogenéticos, biotecnología, fisiología vegetal, edafología, fertilidad y nutrición de suelos, riego, protección vegetal, malezas, ecología y medio ambiente, maquinaria, sistemas de producción y tecnología de alimentos, entre otros.

La remisión de un trabajo a la revista implica que no ha sido publicado ni enviado simultáneamente para su publicación en otro medio. Los artículos y notas son revisados y evaluados por reconocidos especialistas para asegurar su calidad científica. El contenido de los trabajos (artículos, notas, ensayos...) es de la exclusiva responsabilidad de los autores.

INDIZACIÓN

AGRONOMÍA TROPICAL es reseñada e indizada por CAB Internacional (Reino Unido); TROPAG, Royal Tropic Institute (Holanda); REFERATIVNYI ZHURNAL, All-Russian Institute of Scientific and Technical Information (Rusia); AGRIS, FAO (Roma); Base Agrícola Venezolana, INIA (Venezuela); Centro de Información y Documentación (Cuba); REVENCYT, Fundacite Mérida (Venezuela); PERIÓDICA, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias, UNAM (México); REDPAV, Fundación Polar (Venezuela); WILDLIFE REVIEW ABSTRACTS, NISC Colorado (USA); BIOSIS Zoological Record (Reino Unido); AGRÍCOLA, National Agricultural Library (USA); Pest Directory, International Society for Pest Information (Alemania); LATINDEX, Directorio de Publicaciones Científicas de América Latina; Bibliografía Edafológica Venezolana, Sociedad Venezolana de la Ciencia del Suelo; MegaBase AGRI 2000, IICA-CATIE; Catalogue en Ligne del Institute de l'Information Scientifique et Technique, Francia; Base de Datos REVIS, CATIE, Costa Rica, Science citation index.

SUSCRIPCIÓN

Venezuela: 125 000,00

Países en desarrollo: US\$ 95, incluyendo costos de envío
(Developing countries) (including shipping)

Países desarrollados: US\$ 100, incluyendo costos de envío
(Developed countries) (including shipping)

DIRECCIÓN

La correspondencia debe dirigirse a: **AGRONOMÍA TROPICAL**, Av. Universidad, vía El Limón, Edificio Gerencia General, INIA. Apartado 2103. Maracay 2105. Aragua-Venezuela. Los envíos por concepto de CANJE (EXCHANGE) deben dirigirse a: BIBLIOTECA, Centro Nacional de Investigaciones Agropueciarias, INIA. Apartado 4653. Maracay 2101. Aragua-Venezuela.

Correo Electrónico: agrotrop@fundacite.arg.gov.ve

Página Electrónica: <http://www.redpav-polar.info.ve.agrotrop>

AGRONOMÍA TROPICAL

**Revista trimestral del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
Maracay, Venezuela**

Agronomía Trop. /Vol. 56 /Nº4/Octubre-Diciembre 2006/ISSN 0002-192X

FUNDADORES

Luis Medina (Dir.), Bruno Mazzani[†], W. S. Iljin, Rafael Pontis Videla, Jesús Silva Calvo, Gino Malagutti, Guiseppe Ravanello, Luis A. Salas F., S. Horovitz, P. Obregón y Dora M. de Zerpa.

EDITOR: Milagros Fernández

EDITOR ASISTENTE: Mónica González

COMITÉ EDITORIAL

Milagros Fernández
María González

Félix San Vicente
Klaus Jaffé

CONSEJO DE REDACCIÓN

José San José. IVIC. Caracas
Gustavo Trujillo. UCV. Fac. de Agronomía
María A. Sobrado. USB. Caracas
José Pérez Roa. CIDIAT. Mérida
Jean Marie Hétiér. ORSTOM. Francia
Eduardo Casanova. UCV. Fac. de Agronomía
Jorge Salas. INIA. CIAE Lara
Eva García. UCV. Fac. de Agronomía
Luis Avilán. INIA. CENIAP. Maracay
Guillermo H. Eyherabide. INIA. Argentina
Gloria I. Puerta. CINECAFÉ. Colombia
Jon Lizaso. Iowa State University
Gustavo Yépez. SYNGENIA. Guatemala
María L. Izaguirre. IVIC. Caracas
Pino. Comisión Chile. Energía Nuclear

Yolanda Guevara. INIA. CENIAP. Maracay
Raúl Mosqueda Vásquez. INIFAP. México
Alfredo Layrisse. UCV. Fac. de Agronomía
Juan Comerma. PALMAVEN. Carabobo
David Beck. CIMMYT. México
Zaida Lentini. CIAT. Colombia
Graciano Elizalde. UCV. Fac. de Agronomía
Marisol Castrillo. USB. Caracas
José Barreiro Méndez. USB. Caracas
Juan Blanquer. Univ. Politec. Valencia. España
Ramón Rossel. Univ. Nac. del Sur. Argentina
Lelys Bravo. USB. Caracas
Berto Arias. INIA. CIAE Monagas
María Juana Pérez. INIA. CENIAP. Maracay Inés
Segundo Urquiaga. EMBRAPA. Brasil

**Se agradece al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (Fonacit)
el apoyo financiero otorgado para la edición de este número**

AGRONOMÍA TROPICAL

Vol. 56-2006

Octubre-Diciembre

Nº 4

ISSN 0002-192X

Depósito Legal pp 195102AR73

ÍNDICE

Nota de la Redacción

Editorial

Artículos:

Pág.

Percepción Pública de la Biotecnología:

- MARTÍNEZ H. , R. J., C. E. ESPOSITO de D. y E. A. ARNAO T.
Diagnóstico de congruencia interna en la percepción de la
biotecnología moderna: enfoque micro-político para el caso
de Fundación DANAC..... 473
Diagnosis of interal congruity in the perception of modern
biotechnology: micropiltical approach for the case of DANAC
Foundation.

Especialidad Biotecnología Animal:

- CABRERA, P., A. FERNÁNDEZ, T. DÍAZ, P. BASTIDAS, M.
MOLINA, A. BETHENCOURT y E. ASCANIO. Efecto
Teratógeno de la Aflatoxina B1 sobre embriones murinos..... 485
Teratogenic effect of B1 Aflatoxin on murine embryos.
- CABRERA, P., A. FERNÁNDEZ, T. DÍAZ, P. BASTIDAS, M.
MOLINA, A. BETHENCOURT, I. VIVAS, Y. REYES y F.
SIFONTES. Efecto del número de embriones por pajueta sobre
la viabilidad morfológica post vitrificación en embriones
murinos obtenidos *in vivo*..... 489
Effect of the number of embryos per straw on the post-
vitrification morphological viability of murine embryos
obtained *in vivo*.

Artículos:	Pág.
GONZÁLEZ, M., E. B. , B. GONZÁLEZ, N. LINARES, A. MIJARES, T. PERRONE y M. MENDOZA. Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la tripanosomosis animal causada por <i>Trypanosoma evansi</i>	495
Standardization of a polimerase chain reaction technique por the diagnosis of animal trypanosomiasis caused by <i>Trypanosoma evansi</i> .	
TAVARES-MARQUES, L. y A. REYNA-BELLO. Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina.....	501
Standardization of PCR technique por diagnosis of bovine and ovine anaplasmosis.	

Especialidad en Procesos Industriales:

GRANITO, M., J. GUINAND y D. PÉREZ. Composición química y nutricional de variedades <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivadas en Venezuela.....	513
Chemical and nutritional composition of Venezuelan <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivated varieties.	
SANGRONIS, E., A. TORRES y N. SANABRIA. α -Galactósidos y fitatos en semillas germinadas de <i>Phaseolus vulgaris</i> y de <i>Vigna sinensis</i>	523
Phytates and α -Galactosides in germinated seeds of <i>Phaseolus vulgaris</i> and <i>Vigna sinensis</i> .	
RAMOS de V., M. y E. SANGRONIS. Influencia de la germinación en la composición del <i>Phaseolus vulgaris</i> y de <i>Vigna sinensis</i>	531
Influence of germination on composition of <i>Phaseolus vulgaris</i> and <i>Vigna sinensis</i> .	

Artículos:	Pág.
GRANITO, M., Y. VALERO, R. ZAMBRANO y M. GUERRA. Desarrollo y caracterización de una galleta extendida con caraotas blancas.....	539
Development nad characterization of a cookie extended with white beans.	

Especialidad en Biotecnología Vegetal:

PERDOMO-LEIVA, M. C., E. ARNAO, C. RAMIS, Y. de FARIA e I. PÉREZ-ALMEIDA. Avances en la obtención de huellas moleculares en genotipos de arroz mediante isoenzimas con fines de propiedad intelectual.....	549
Advances on isoenzyme molecular fingerprinting of rice genotypes with intelectual property right purposes.	
BERNAL, C., I. GALINDO, D. PÉREZ y N. DIEZ. Aplicación de la proteómica comparativa para la identificación de proteínas en <i>Phaseolus vulgaris</i> asociadas a resistencias a plagas.....	555
Application of comparative proteins in <i>Phaseolus vulgaris</i> associated with pest resistance.	
MOLINA, G., M. VIELMAT., M. TACORONTE y M. BRICEÑO. Micropropagación de <i>Musa</i> spp. (plátano var. manzano AAB) a partir de meristemas florales.....	561
Micropropagation of <i>Musa</i> spp. (Plátano var. manzano AAB) from floral meristems.	
ALVA T., S.,M. OROPEZA y T. E. VARGAS. Organogénesis de raíces en geranio.....	571
Root organogenesis in geranium.	
PÉREZ H., G. Y., C. C. MICHELANGELI de CLAVIJO y A. M. MEDINA M. Morfogénesis <i>in vitro</i> de Drasenas.....	577
<i>In vitro</i> morphogenesis of Dracena.	

Artículos:	Pág.
TORREALBA N., G. T., E. SALAZAR, R. ÁLVAREZ, N. DELGADO, R. FIGUEROA. O. MORENO, W. CASTRILLO, E. REYES, O. TORRES, M. NAVAS, M. SALAZAR, M. ACEVEDO, E. TORRES, P. ABREU y C. GAMBOA. Variación somaclonal en seis genotipos de arroz.....	585
Somaclonal variation of six rice genotypes.	
VELÁSQUEZ S., R., J. COLMENARES, M. CHIRINOS, A. NOGUERA y M. PÉREZ. Embriogénesis somática en Samán.....	593
Somatic embryogenesis in pod tree.	
OROPEZA C., M., E. A. MARILYN R. y T. E. VARGAS C. Establecimiento de un protocolo RAPDs eficiente para plantas de ñame.....	601
Establishment of an efficient RAPD protocol for yam plants.	
MATEHUS, J., G. ROMAY y M. A. SANTANA. Multiplicación <i>in vitro</i> de ocumo y taro.....	607
<i>In vitro</i> micropropagación of cocoyam and taro.	
RAMÍREZ, V., M. del C., E. de GARCÍA y H. J. FINOL. Ultraestructura de callos embriogénicos y no embriogénicos de banano Williams (AAA, <i>Musa</i> spp.).....	615
Ultrastructural studies on embryogenic and non embryogenic calluses from Williams' banana (<i>Musa</i> spp.).	
VARGAS C., T. E., M. OROPEZA C. y E. de GARCÍA. Propagación <i>in vitro</i> de <i>Hippeastrum</i> sp.....	621
Propagation of <i>Hippeastrum</i> sp.	
RIVERO, M., G. del C., M. del C. RAMÍREZ V. y S. L. de SIERRALTA. Efecto de la planta madre en el establecimiento <i>in vitro</i> del guanábano.....	627
Effect of stock plant on the <i>in vitro</i> establishment of soursop.	

Artículos:	Pág.
CHIRINOS, M., R. VELÁSQUEZ, A. NOGUERA, M. PÉREZ, J. MATA y D. POLANCO. Cultivo de anteras en dos clones de yuca..... Anther culture in two cassava clones.	633
FERNÁNDEZ, H., F. SAN VICENTE, C. MARÍN y D. TORREALBA. Determinación de la relación genética entre líneas de maíz usando marcadores SSR..... Determination of the genetic relationship between genetic maize lines using SSR markers.	643
BRUCATO, G., M. GRAZIELLA, I. E. TRUJILLO DÍAZ y M. OROPEZA. Micropropagación de <i>Lepidium virginicum</i> L. a partir de microesquejes..... Micropropagation of <i>Lepidium virginicum</i> L. from microcuttings.	651
MARCANO, A. K., E. VALDIVIESO y M. OROPEZA. Detección de actividad fosfata ácida a partir de callos embriogénicos y no embriogénicos de caña de azúcar..... Determination of acid phosphatase activity from embryogenic and non embryogenic sugarcane calluses.	657
DE LIMA MÉNDEZ, N. A., M. OROPEZA, A. PÉREZ y I. E. TRUJILLO DÍAZ. Análisis de la estabilidad genética de plantas de <i>Stylosanthes capitata</i> Vog. regeneradas “ <i>in vitro</i> ” utilizando marcadores RAPDs..... Analysis of genetic stability of micropropagated plants of <i>Stylosanthes capitata</i> Vog. using RAPDs markers.	663
GHNEIM-HERRERA, T., A. ROSALES, M. AGUILAR, A. J. PIETERS, I. PÉREZ ALMEIDA y G. TORREALBA. Identifi- cación de cultivares de arroz con alta capacidad de ajuste osmótico para el mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía..... Identification of rice cultivars with high osmotic adjustment capacity for the genetic improvement of drought tolerance.	677

Artículos:	Pág.
GONZÁLEZ A., J. A., M. OROPEZA, T. E. VARGAS y E. de GARCÍA. Embriogénesis somática en dos especies del género <i>Plantago</i> (<i>Plantago major</i> L. y <i>Plantago hirtella</i> Kunth)..... Somatic embryogenesis for two species of <i>Plantago</i> genus (<i>Plantago major</i> L. y <i>Plantago hirtella</i> Kunth).	687
URDANETA GONZÁLEZ, J., R. VALERIO, T. E. VARGAS y E. de GARCÍA. Aspectos morfoanatómicos de callos originados durante el proceso de embriogénesis somática en banano Williams subgrupo Cavendish (<i>Musa</i> sp. grupo AAA)..... Morphoanatomic aspects of callus originated during the induction process of somatic embryogenesis in banana Williams, subgroup Cavendish (<i>Musa</i> sp. grupo AAA).	695

Índice Acumulativo

Instrucciones a los Autores

NOTA DE REDACCIÓN

La editora y quienes conforman el Comité Editorial de la revista, agradecen a las personas que a continuación se mencionan, por el trabajo de revisión a los materiales que se publican en el Vol. 56, 2006:

María Fernanda Rodríguez	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Tibayde M. Sánchez	UCV. Facultad de Agronomía.
Nelly Delgado	INIA. CIAE-Portuguesa.
Inés Pino	Dpto. de Aplicaciones. de Inv. Agropecuarias.
Rosalía Velásquez	UCV. Facultad de Agronomía.
Orlando Moreno	INIA. CIAE-Portuguesa.
Estela Brandán	Universidad de Catamarca.
Efraín Salazar	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Jon Lizaso	University of Florida. Gainesville. USA.
Asdrúbal Aponte	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Atilio Higuera	Universidad del Zulia.
Alfonso Ordosgoitti	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
José Vicente Lazo	UCV. Facultad de Agronomía.
Adolfo Cañizares	INIA- CIAE, Monagas.
Evelina Pérez	University WI- Stout.
Damelis García	UCV. Facultad de Agronomía.
Augusto Aponte	INIA. CIAE-Lara.
Inés García	Universidad de Almería- España.
Rodolfo Delgado	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Armando Ramírez	UCV. Facultad de Agronomía.
María Juana Pérez	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Herman Nass	Agropecuaria El Retorno.
Emma Ramírez	INIA. CIAE-Yaracuy.
José Luis García	UCV. Facultad de Agronomía.
Norkys Meza	INIA. CIAE-Trujillo.
Castor Zambrano	UCV. Facultad de Agronomía.
Yanely Alfaro	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Olga Arnaude	UNET. Univ. Naci. Experimental del Táchira.

../... continúa

../ continuación

Pedro García	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Juan Comerma	PALMAVEN. Guacara, Venezuela.
Grigna Piña	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Eduardo Casanova	UCV. Facultad de Agronomía.
Juan Carlos Rey	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Alexander Hernández	UCLA. Decanato de Agronomía.
Alicia Ronco	Fac. de Ciencias Exactas. Univ. Nac. de la Plata.
Orlando Torres	INIA. CIAE-Barinas.
Antonio Bretaña Noguera	IDECYT-CEBIV. Univ. Nac. Exp. S. R.
Catalina Rey	UNEFM. Estado Falcón.
Marta Mendoza	IDECYT-CEBIV. Univ. Nac. Exp. S. R.
Hilda Fernández	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
José Vilchez	LUZ. Facultad de Agronomía.
Iris Pérez. INIA	Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Armando Reyna	IDECYT. Univ. Nac. Exp. Simón Rodríguez.
José G. Albarrán	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Maira Oropeza	UCV. Facultad de Agronomía.
Nancy Arcila	Universidad Nac. Exp. Simón Rodríguez.
Marcia Toro	UCV. Facultad de Ciencias.
María Malacarne	Fundación IDEA.
Unai Emaldi	UCV. Facultad de Ciencias.
Iselen Trujillo	Universidad Nac. Exp. Simón Rodríguez.
Ariadne Vegas	INIA. Centro Nac. de Inv. Agropecuarias.
Aída Ortiz Domínguez	UCV. Facultad Agronomía.
Alpidio Boada	IDECYT. Univ. Nac. Exp. Simón Rodríguez.
María Santana	USB. Dpto. de Biología Celular.
Teresa Vargas	UCV. Laboratorio de Biotecnología Vegetal.
Nilca Albany	LUZ. Facultad de Agronomía.
Orlando Quijada	INIA. CIAE-Zulia.
Helis Hernández	Centro de Inv. del Estado Prod.Exp.Agroindustrial.
Rafael Gómez	Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.

EDITORIAL

“BIOTECNOLOGÍA EN VENEZUELA: UNA ESTRATEGIA PARA GARANTIZAR LA SEGURIDAD ALIMENTARIA”

La investigación y el desarrollo de la biotecnología en Venezuela han venido emergiendo en los últimos años en forma dispersa, a partir de iniciativas gubernamentales y no gubernamentales. Sin embargo, esta actividad no ha tenido la relevancia e impacto deseables, en consecuencia, se plantea la imperiosa necesidad de interconectar y vincular a todos los actores del proceso biotecnológico y así potenciar su efecto en solucionar problemas específicos y mejorar la calidad de vida de los venezolanos.

En Venezuela la Seguridad Alimentaria es una prioridad de Estado y tiene rango constitucional ya que el Artículo 305 de la Constitución plantea: “El Estado promoverá la agricultura sustentable como base estratégica del desarrollo rural integral a fin de garantizar la seguridad alimentaria de la población; entendida como la disponibilidad suficiente y estable de alimentos en el ámbito nacional y el acceso oportuno y permanente a éstos por parte del público consumidor. La seguridad alimentaria se alcanzará desarrollando y privilegiando la producción agropecuaria interna, entendiéndose tal la proveniente de las actividades agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola. La producción de alimentos es de interés nacional y fundamental para el desarrollo económico y social de la Nación. A tales fines, el Estado dictará las medidas de orden financiero, comercial, transferencia tecnológica, tenencia de la tierra, infraestructura, capacitación de mano de obra y otras que fueran necesarias para alcanzar niveles estratégicos de autoabastecimiento.

El plan de desarrollo económico y social de 2001-2007 establece como un objetivo estratégico garantizar la seguridad alimentaria a través de mejorar y ampliar los programas de formación y capacitación técnica y empresarial poniendo el énfasis en la investigación agropecuaria a nivel de los centros e instituciones científicas que realizan esta tarea.

En esta dirección el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCT) prioriza el Programa de BIOTECNOLOGÍA para contribuir a conformar redes que vinculen a los investigadores y centros de investigación en un esfuerzo de identificar potencialidades para crear sinergias y contribuir con el objetivo de garantizar seguridad alimentaria. Por esto el MCT apoya la creación y consolidación de redes de actores como una estrategia exitosa para el intercambio de información y el consenso de políticas públicas. Igualmente apoya la creación de postgrados nacionales en biotecnología con la participación de los institutos de investigación y universidades que trabajan en el área de biotecnología.

En consecuencia, la reactivación de la REDBIO-FAO, Capítulo Venezuela se inscribe en las líneas prioritarias del MCT, ya que busca además optimizar los esfuerzos de investigadores y otros actores del circuito agroalimentario. La REDBIO-FAO es un foro técnico para apoyar la consolidación de la biotecnología como una opción viable para dinamizar la agricultura en el país. En este contexto se organizaron los eventos de REDBIO Venezuela en el 2003 en el IDEA, y en Maracay en el 2005. La REDBIO/FAO-Venezuela y el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCT) a través de sus organismos adscritos (IDEA, INIA, IVIC), conjuntamente con las Universidades Nacionales (UCV, UNESR, UCLA, UDO, ULA, USB, LUZ, UNET, UNEG, UPEL, UNEY, UNEFM), tuvieron a cargo la organización del “Encuentro Nacional 2005.

El tema central del Congreso fue **“Biotecnología en Venezuela: una Estrategia para Garantizar la Seguridad Alimentaria”**. El Comité Organizador y las Comisiones de Apoyo elaboraron un conjunto de actividades orientadas a generar discusión, intercambio y transferencia de información, que permitieron la evaluación del quehacer científico y tecnológico, así como, proposición de políticas de desarrollo y acciones que constituyan alternativas para enfrentar los problemas de Soberanía Alimentaria en la Venezuela del mañana.

La REDBIO-Venezuela se propone agrupar todas las instituciones y empresas que desarrollan biotecnología agroalimentaria en nuestro país, para proporcionar a tal efecto el ambiente necesario que promueva la generación de conocimiento, el desarrollo productivo, el uso racional de la biodiversidad y que contribuya a la modernización e integración de esta importante actividad en el contexto nacional e internacional. Se plantea impulsar el desarrollo de programas de biotecnología agroalimentaria integrando a las instituciones líderes del país, promoviendo

sinergia entre la academia, la investigación e industria, favoreciendo la colaboración y el permanente intercambio de conocimientos con organizaciones internacionales. De esta forma, se busca mejorar la calidad de vida de la sociedad en general y de las poblaciones en situación crítica en particular.

La biotecnología representa una esperanza para aumentar la disponibilidad de alimentos de alta calidad y que ésta pueda llegar al inmenso conglomerado humano y en especial aquellos que han quedado rezagados. La biotecnología deberá ofrecer productos sanos y accesibles a la población más pobre y sin crear dependencias de las grandes empresas transnacionales del agro. El reto es que se realicen las innovaciones y que los agricultores de los países pobres tengan acceso a ellas de manera eficiente y de buena rentabilidad.

Y en el marco de este evento se propuso la edición de un número especial de **Agronomía Tropical**, como una manera de destacar, difundir y divulgar la investigación realizada en esta área en nuestro país.

Percepción Pública de la Biotecnología

DIAGNÓSTICO DE CONGRUENCIA INTERNA EN LA PERCEPCIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA: ENFOQUE MICRO-POLÍTICO PARA EL CASO DE FUNDACIÓN DANAC

Rodolfo J. Martínez H.*, Concetta E. Esposito de D.**
y Erika A. Arnao T.*

RESUMEN

Comunicar resultados relacionados con el uso de nuevas tecnologías (vg. biotecnología moderna-BM), atiende al cumplimiento de la misión de las organizaciones que las emplean, y forma parte de los estudios en percepción pública (PP) recomendados en el VI Taller de Indicadores en Ciencia y Tecnología de la Red Iberoamericana de Indicadores de Ciencia y Tecnología. Durante el IV Taller de capacitación del proyecto PNUMA/FMAM para el marco nacional de biotecnología en Venezuela (2005), dedicado a la PP y educación de la BM, se resaltó la importancia que tiene la comunicación social del tema y las expectativas que genera en la sociedad los riesgos y beneficios en la aplicación de la nueva tecnología, buscándose así el objetivo de transferir, manipular y utilizar de forma segura los organismos modificados genéticamente. Este trabajo presenta un diagnóstico de congruencia interna de los donadores de información de un centro de investigaciones agrícolas denominado Fundación DANAC (percepción de actores), y su expresión cualitativa mediante la teoría micro-política de Ball (citado por Bardisa, 1997), como parte de una estrategia de gestión comunicacional interna. Los resultados son: **i)** conformación de grupo de opinión de 4 investigadores; **ii)** análisis de 7 criterios para el desarrollo del enfoque implícito de la ciencia de la organización y **iii)** acuerdo en 2 componentes de actualización para mejorar el desempeño del proyecto de gestión comunicacional.

Palabras Clave: Gestión comunicacional; percepción pública de investigadores de DANAC; biotecnología moderna.

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola Danac (DANAC). Apdo. Postal 182. E-mail: rmartine@danac.org.ve - earnao@danac.org.ve

** Profesora jubilada. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado (UCLA). E-mail: concettaesposito@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

DIAGNOSIS OF INTERNAL CONGRUITY IN THE PERCEPTION OF MODERN BIOTECHNOLOGY: MICROPOLITICAL APPROACH FOR THE CASE OF DANAC FOUNDATION

Rodolfo J. Martínez H.*, Concetta E. Esposito de D.
y Erika A. Arnao T.***

SUMMARY

To communicate results related to the use of new technologies (e.g. Modern bio-technology - MB), gives fulfillment to the mission of the organizations that use them and it is part of the studies in public perception (PP) recommended by the Ibero-American net of Indicators of Science and Technology (VI Workshop of Science and Technology Indicator). During the IV training workshop of PNUMA/FMAM project for the national frame of bio-technology in Venezuela (2005), dedicated to the PP and MB education, the importance that social communication has on this topic and the expectations about risk and benefits that new technology applications generates in the society were highlighted, with the aims of transferring, to manipulating and to using genetically modified organisms in a sake manner. This work presents a diagnosis of internal congruity of the information donors of the agricultural research center called Fundación DANAC (Actor's perception), and its qualitative expression according to Ball's micro-political theory (Mentioned for Bardisa, 1997), as a strategy of internal communication management. The results are: i) Conformation an opinion group of 4 researches, ii) analysis of 7 criteria for the development of the implicit approach into the science of the organization science, iii) agreements in 2 update components to improve the performance of communication management project.

Key Words: Communicational management; public perception of DANAC investigators; modern biotechnology.

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola Danac (DANAC). Apdo. Postal 182. E-mail: rmartine@danac.org.ve - earnao@danac.org.ve

** Profesora jubilada. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado (UCLA). E-mail: concettaesposito@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las diatribas entre información y opinión en ciencia y tecnología, entre donadores y usuarios de información técnico-científica, han propiciado su comprensión con base en diversas disciplinas del conocimiento. Los estudios sobre “comprensión y actitudes del público respecto al desarrollo científico-tecnológico” se iniciaron en 1972 por iniciativa de la National Science Foundation (Cruces y Vessuri, 2005). Ese estudio de percepción destaca la baja comprensión que tiene el público en general sobre los métodos de la ciencia.

Con relación a los donadores de información técnica (aquellos usuarios directos de los métodos científicos), la Organización de Estados Iberoamericanos ha promovido estudios que facilitan, paralelamente con la sociología, la educación y la administración como multitenfoque, la comprensión del papel de éstos en la formalización del conocimiento objeto de transferencia. Bardisa (1997) aporta para el análisis, la visión de las empresas desde las percepciones individuales del sistema humano que integra a la organización (enfoque micropolítico), hasta la estructura formal de relación con el entorno (enfoque macropolítico).

Del entorno macro, el desarrollo del Marco Nacional de Seguridad de la Biotecnología en Venezuela (2005), como mandato desde la entrada en vigor (12/09/03) del Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología (publicada en Gaceta Oficial N° 37 355 de fecha 2 de enero de Ministerio de Ciencia y Tecnología 2002). Especialmente los talleres de marco jurídico y de percepción pública (PP) y educación de la biotecnología moderna (BM), exigieron un compromiso de educar en dos ámbitos: la formación institucional o capacidad técnica y la formación ciudadana para el público en general.

Michelangeli de Clavijo en el 2003 indica que en Venezuela, la capacidad investigativa en PP de la BM, está en los primeros estados de desarrollo: “tenemos una sociedad sin experiencia respecto al tema biotecnológico que se encuentra particularmente desinformada y con poca educación en el tema”.

El objetivo del trabajo es presentar un diagnóstico de congruencia interna (entorno micro) de los donadores de información de un centro de investigaciones agrícolas (Fundación para la Investigación Agrícola DANAC, 1986), organización no gubernamental (ONG) perteneciente al sector

público no estatal (según clasificación de Cunill Grau, 1995), y su expresión cualitativa mediante la teoría micro-política de Ball (Bardisa, 1997), como parte de una estrategia de gestión comunicacional de la ONG. Ello apropiándose del concepto de “lógica de acción” que relaciona a la dimensión macro (legislativa, política, social, económica) con la micro (relaciones, tensiones, conflictos, peculiaridades) y su influencia en la toma de decisiones para la difusión de información sobre BM.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación cualitativa (estudio de caso) considera el esquema de Hammersley (1987) citado por Rodríguez *et al.* (1996): 1) la adición de los conceptos como ‘verstehen’¹ o comprensión y la ‘lógica de acción’ como elemento de relación; 2) la aclaración de conceptos en tecnología como BM, en comunicación como PP, y entorno político; 3) el desarrollo y comprobación de medidas con aplicación de instrumento tipo encuesta a investigadores en la ONG y análisis de documentos de proyectos DANAC y de los talleres del proyecto PNUMA/FMAM (2003) y 4) verificación de la hipótesis de comprensión micro-política para la toma de decisiones en el proyecto de gestión comunicacional. La metodología establecida en la encuesta fue aplicada al universo de investigadores DANAC (10 personas), en dos años distintos, con instrumento tipo cuestionario. Descritos los aspectos que se estudian, los resultados se presentan en el Cuadro de comparación de uso de BM, y se contrastan con i) la conformación de grupos de opinión, ii) los criterios para el desarrollo del enfoque implícito de la ciencia de la organización, y iii) los componentes de actualización para mejorar el desempeño del proyecto de gestión comunicacional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El instrumento se aplicó a 10 personas (8 investigadores y 2 asistentes de investigación) de Fundación DANAC (29.06.05), como complemento del aplicado en 2003 a las mismas personas. Se usó estadística descripti-

¹ La comprensión en las ciencias sociales sirve para conocer el significado de las acciones, para establecer analogías entre experiencias propias y sucesos externos.

va para en análisis de los datos contenidos en el Cuadro “Respuestas sobre el uso de BM obtenidas del instrumento comparadas con el uso efectivo en los proyectos de investigación DANAC”.

Los resultados del instrumento aplicado en 2003, indican incongruencia en el uso de la BM al contrastarla con lo presentado en los proyectos ejecutados para ese mismo período: 5 investigadores dicen usarla, pero sólo 2 lo señalan (1 en biotecnología vegetal y 1 en mejoramiento genético). Para 2005, por el contrario, 3 investigadores dicen usar BM y 4 lo muestran en sus proyectos. Hay congruencia inalterada en el tiempo por parte de la unidad de biotecnología vegetal, así mismo, es congruente lo demostrado por el resto de investigadores, quienes no la usan.

Los investigadores que señalan su uso, están conscientes de la utilidad de la BM como herramienta que “mejora la eficiencia y eficacia de los programas de mejoramiento...”. La discusión debe contestar si los donadores de información en BM, han internalizado mediante su quehacer científico, los usos y potencialidades de ésta, ponderando sus riesgos y beneficios dentro de su actividad técnica, como parte de su formación institucional.

Estas conclusiones coinciden con lo expuesto por Díaz (2005): “...la percepción de la Biotecnología Moderna está asociada al área de desempeño profesional, a las concepciones sobre la relación de las personas con la naturaleza, a la disponibilidad de información que incida en el conocimiento, entendimiento y las opiniones...”, también coincide con los planteamientos del Código de bioética y bioseguridad del Ministerio de Ciencia y Tecnología, cuya compiladora fue la Soc. Eva Briceño (2002), donde insta a vincular la praxis con el manejo del riesgo.

CONCLUSIONES

Son agrupadas en tres aspectos:

Conformación de grupos de opinión

- i) La motivación principal que estructura a los usuarios directos de la BM (4 investigadores), es la ampliación del uso de la tecnología en los proyectos futuros. Han obtenido financiamiento externo para tal fin, y tal acción es autorizada por el cuerpo gerencial. Los resultados

CUADRO. Respuestas sobre el uso de Biotecnología Moderna obtenidas del instrumento comparadas con el uso efectivo en los proyectos de investigación DANAC.

Área de conocimiento principal del proyecto	Porcentaje de personas que usan BM en sus actividades de investigación (instrumento)		Porcentaje de personas que usan BM en sus actividades de investigación (proyectos)	
	2003	2005	2003	2005
Biotecnología vegetal	10	10	10	10
Mejoramiento genético	40	20	10	30
Otros (1)	0	0	0	0
Total	50	30	20	40

Fuente: Primer informe trimestral de seguimiento en Gestión de innovación tecnológica e información DANAC 2005-2006.
Leyenda: (1) Calidad de granos, Economía agrícola, Forestal, Gestión tecnológica.

de tales actividades tienen un canal natural para ser comunicados, y validados por agentes externos a la ONG.

ii) Criterios para el desarrollo del enfoque implícito de la ciencia de la organización.	
Perspectiva micropolítica (enfoque explícito)	Manifestación implícita en el análisis de textos de la ONG
Poder	Se reconoce como paso previo del uso de la BM, las consideraciones que la gerencia de la ONG manifiesta en los prolegómenos de presentación de informes de gestión anual 2002-2005. Se ejerce autoridad.
Diversidad de metas	Este punto se convierte en 'coherencia de metas', especialmente con los investigadores en mejoramiento genético para 2005. Se destaca un esfuerzo en los investigadores en economía, calidad y gestión tecnológica, de integrar el uso de BM en la gestión interna de bioseguridad.
Disputa ideológica	Hay un manifiesto interés en el cuerpo de investigadores de presentar resultados técnicos con neutralidad, sin increpar el rezago legal venezolano en otros usos de la BM.
Conflicto	No se encontraron contradicciones en la aplicación de BM por los donadores de información (investigadores), hay consenso en usarla de manera extendida en los demás proyectos que se emprendan.
Intereses	La lógica de acción que conecta lo macro en la ONG, ha impulsado el uso de la BM en los últimos 3 años. La motivación sobre el uso controlado de BM, pasó a formar parte de las herramientas de trabajo de todos los mejoradores.
Actividad política	La matriz de opinión interna sobre el uso de la BM, el grado de coherencia actual, permite a la gerencia tomar la decisión de incorporarla como parte de los contenidos de una estrategia comunicacional institucional.
Control	Se está desarrollando un acuerdo consensuado gerencia-investigadores para liberar información con calidad, al público objetivo de la ONG: información con contenido para científicos, agricultores y estudiantes (Escobar y Martínez, 2005).

- iii) Componentes de actualización para mejorar el desempeño del proyecto de gestión comunicacional.
- El sub-sistema de aportantes o donadores de información técnica sobre el uso de la BM, es considerado por el sistema de información tecnológica de la ONG. Los principales acuerdos de difusión son: la BM aplicada en la organización no incluye las técnicas de transgénesis, la bioseguridad y los protocolos técnicos de ensayos de prueba son parte de la información a suministrar, los resultados son presentados como logros co-gestionados con los pares.

BIBLIOGRAFÍA

BARDISA, T. 1997. Teoría y práctica de la micropolítica en las organizaciones escolares. Revista Iberoamericana de Educación. Número 15 Micropolítica en la Escuela. Septiembre – Diciembre. OEI. Revisado el 20/06/05 en <http://www.rieoei.org/oeivirt/rie15a01.htm>

DÍAZ, L. y C. MICHELANGELI de CLAVIJO. 2005. Percepción de la biotecnología moderna en tres facultades de la Universidad Central de Venezuela. II Congreso Venezolano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola. Revisado el 25/02/07 en <http://www.danac.org.ve/ocs/viewabstract.php?id=20&cf=1> Ministerio de Ciencia y Tecnología. 2002 Código de bioética y bioseguridad. Revisado el 25/02/07 en <http://www.miproyecto.gov.ve/anexos/bioetica.pdf>

CRUCES, J. y H. VESSURI. 2005. Ciencia y tecnología: venezolanos participan y opinan. Primera encuesta nacional de percepción pública de la ciencia, cultura científica y participación ciudadana. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Caracas. Venezuela.

CUNILL GRAU, N. 1995. La Rearticulación de las relaciones del Estado-sociedad: en búsqueda de nuevos sentidos. Revista Reforma y Democracia. Centro Latinoamericano de Administración para el Desarrollo. Nº 4. Revisado el 20/09/05 en <http://www.clad.org.ve/reforma.html>.

ESCOBAR, M. y R. MARTÍNEZ 2005. Sistema de información tecnológica e institucional Danac, Documento conceptual. Documento de trabajo, formato electrónico. Fundación DANAC.

MARCO NACIONAL DE SEGURIDAD DE LA BIOTECNOLOGÍA

EN VENEZUELA. 2005. Análisis global de sus componentes. Memorias en electrónico. Revisado el 21/02/06 en http://www.minamb.gob.ve/images/acrobat/Marco%20Nacional%20de%20Bioseguridad_928.pdf

MICHELANGELI de CLAVIJO, C. 2003. Situación de los OMG y percepción pública de la biotecnología moderna en Venezuela. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA). Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. **In:** I Congreso de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola. Memorias electrónicas. Maracay.

PROGRAMA DE NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE / FONDO PARA EL MEDIO AMBIENTE MUNDIAL. 2003. Talleres subregionales PNUMA/FMAM de bioseguridad para América Latina sobre la elaboración de sistemas reglamentarios y administrativos en relación con los marcos nacionales de bioseguridad. Santiago de Chile. <http://www.unep.ch/biosafety/development/countryreports/VEprogressrep.pdf>.

RODRÍGUEZ, G., J. GIL y E. GARCÍA. 1996. Metodología de la investigación cualitativa. Málaga: Aljibe.

Especialidad Biotecnología Animal

EFFECTO TERATÓGENO DE LA AFLATOXINA B1 SOBRE EMBRIONES MURINOS

**Pedro Cabrera*, Adriana Fernández*, Thaís Díaz*,
Pedro Bastidas*, Magaly Molina**,
Angélica Bethencourt* y Elias Ascanio***

RESUMEN

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, que causan efecto carcinógeno en roedores adultos, además de daños teratógenos en embriones, posterior a la implantación. Al someter ratones hembra donadoras de embriones en estadios preimplantacionales a dos niveles de aflatoxina B1 (AFB1) presentes en el alimento, se pudo evidenciar una reducción marcada del grado de calidad embrionaria en aquellos animales que consumieron el alimento con el mayor nivel de AFB1 (3,6 ppb), mientras que en las hembras donadoras en contacto con niveles menores de AFB1 (0,8 ppb) se colectaron embriones con excelente grado de calidad morfológica. A través del presente hallazgo se concluye que los altos niveles de AFB1 influyeron negativamente en la calidad de embriones murinos producidos *in vivo*.

Palabras Clave: Embrión; murinos; aflatoxina.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

** Investigadora III. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal. Apdo. 70. Av. Las Delicias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

TERATOGENIC EFFECT OF B1 AFLATOXIN ON MURINE EMBRYOS

Pedro Cabrera*, Adriana Fernández*, Thaís Díaz*,
Pedro Bastidas*, Magaly Molina**,
Angélica Bethencourt* y Elias Ascanio*

SUMMARY

Aflatoxins are mycotoxins produced by *Aspergillus sp.* This type of aflatoxin causes a carcinogenic effect on adult rodents and a teratogenic effect on embryos after implantation. Donor mice females consuming a high level (3,6 ppb) of aflatoxin B1 (AFB1) had a marked reduction on embryo quality, whereas those donors consuming a lower level (0,8 ppb) of AFB1, had embryos with excellent quality. Based on these findings we conclude that high levels of AFB1 (3,6 ppb) had a negative effect on the quality of murine embryos produced *in vivo*.

Key Words: Embryo; murine; aflatoxin.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

** Investigadora III. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal. Apdo. 70. Av. Las Delicias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular, producidas como metabolitos secundarios por los hongos filamentosos (Bennett y Klich, 2003), dentro de ellos destacan los del género *Aspergillus*, cuyas dos especies *A. flavus* y *A. parasiticus* producen aflatoxina (Diekman y Green, 1992). La AFB1 es generalmente conocida como el mayor carcinógeno natural y el más potente agente genotóxico (Wang y Groopman, 1999). En roedores se ha comprobado la capacidad de las micotoxinas de traspasar la barrera placentaria y de esta manera llegar al concepto, causando moderado retardo en el desarrollo fetal (Poapolathep *et al.*, 2004).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de dos niveles de AFB1 en el alimento concentrado sobre la calidad embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dos grupos de 30 ratones hembra vírgenes de la cepa NIH, consumieron alimento concentrado *ad libitum* con dos niveles de AFB1: 0,8 y 3,6 ppb, durante dos semanas antes de ser sometidos al protocolo de superovulación y colecta de embriones descrito por Kuleshova *et al.* (2001). Los embriones colectados fueron clasificados morfológicamente siguiendo los parámetros descritos por Lidner y Wright en 1983.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el grupo de donadoras que consumieron alimento con 0,8 ppb de AFB1 fueron colectados embriones de excelente calidad morfológica, los cuales eran simétricos, esféricos, con células de tamaño, color y textura uniforme, por el contrario las donadoras que consumieron mayores niveles de AFB1 (3,6 ppb), presentaron un descenso en el grado de calidad de los embriones, no observándose diferencia en el número de embriones colectados por donadora. Los embriones, presentaron cambios degenerativos evidenciándose un citoplasma muy claro con puntillado negruzco, sin ningún daño aparente en la zona pelúcida.

En diferentes especies son aceptados bajos niveles de micotoxinas en el alimento; sin embargo, la exposición prolongada de ratones a 10 ppb de AFB1 ocasionó retraso en la tasa de crecimiento así como descenso en los parámetros reproductivos (Díaz y Rubio, 2004). El presente hallazgo resulta de enorme interés, debido a los escasos estudios existentes del efecto de micotoxinas sobre embriones murinos en estadios preimplantacionales. Aunque los niveles de AFB1 encontrados en el alimento no provocaron infertilidad, se puede inferir que los niveles presentes afectaron la calidad de los embriones, repercutiendo de esta manera en su viabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

BENNETT, J. and M. KLICH. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:497 - 516.

DÍAZ, S. and M. RUBIO. 2004. Aflatoxins in rodent diet: effect on growing. **In:** Proceedings of the ICLAS Regional Meeting: Advances in the care and use of Laboratory Animals, ICLAS, Buenos Aires, pp. 107 (Abstr.).

DIEKMAN, M. and M. GREEN. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.*, 70:1.615-1-627.

KULESHOVA, L., J. SHAW and A. TROUNSON. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43:21-31.

LIDNER, G. and R. WRIGHT. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20:407-416.

POAPOLATHEP, A., Y. SUGITA-KONISHI, T. PHITSANU, K. DOI and S. KUMAGAI. 2004. Placental and milk transmission of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice. *Toxicon*, 44:111-113.

WANG, J. and J. GROOPMAN. 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.*, 424:167 - 81.

**EFFECTO DEL NÚMERO DE EMBRIONES
POR PAJUELA SOBRE LA VIABILIDAD
MORFOLÓGICA POST VITRIFICACIÓN
EN EMBRIONES MURINOS OBTENIDOS *in vivo***

**Pedro Cabrera*, Adriana Fernández*, Thaís Díaz*,
Pedro Bastidas*, Magaly Molina**, Angélica Bethencourt*,
Isis Vivas*, Yuraima Reyes* y Freddy Sifontes*****

RESUMEN

La técnica de criopreservación de embriones por vitrificación ha adquirido gran relevancia a nivel mundial debido a lo fácil de su ejecución, los reducidos costos requeridos en equipos y, además por los altos niveles de viabilidad obtenidos post vitrificación. Con el objeto de determinar la influencia del número de embriones cargados en la pajueta antes de la vitrificación sobre la apariencia morfológica inmediatamente después de la misma, se utilizaron 4 tipos de cargado de la pajueta, 1, 2, 4 ó 6 embriones por pajueta, no evidenciándose influencia significativa ($P>0,05$) del tipo de cargado sobre la tasa de recuperación de embriones post vitrificación, ni sobre la tasa de embriones morfológicamente normales y anormales, sin embargo, al vitrificar 4 embriones por pajueta se presentaron numéricamente los mejores resultados.

Palabras Clave: Embrión; murinos; vitrificación.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

** Investigadora III. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Sanidad Animal. Apdo. 70. Av. Las Delicias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

*** Jefe de Bioterio. Instituto Nacional de Higiene "Dr. Rafael Rangel". Distrito Capital. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

**EFFECT OF THE NUMBER OF EMBRYOS
PER STRAW ON THE POST-VITRIFICATION
MORPHOLOGICAL VIABILITY OF MURINE
EMBRYOS OBTAINED *in vivo***

**Pedro Cabrera*, Adriana Fernández*, Thaís Díaz*,
Pedro Bastidas*, Magaly Molina**, Angélica Bethencourt*,
Isis Vivas*, Yuraima Reyes* y Freddy Sifontes*****

SUMMARY

The technique of cryopreservation of embryos by vitrification has acquired great relevance world-wide because of the easiness of the process, the low cost of the equipment and the high levels of viability of the embryos after vitrification. To determine the effect of the number of embryos per straw on the morphological appearance, we used four different numbers of embryos per straw: 1, 2, 4 and 6, obtaining no effects ($P>0.05$) of the number of embryos on the rate of embryo recovery after vitrification, or on the rate of normal embryos. However, the best results were shown when 4 embryos per straw were used.

Key Words: Embryo; murine; vitrification.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

** Investigadora III. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Sanidad Animal. Apdo. 70. Av. Las Delicias. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

*** Jefe de Bioterio. Instituto Nacional de Higiene "Dr. Rafael Rangel". Distrito Capital. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

La vitricación se refiere al proceso físico de solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. El fenómeno puede ser considerado como un incremento extremo de la viscosidad, que requiere de rápidas tasas de enfriamiento y calentamiento (Vajta, 2000), el procesamiento de un elevado número de embriones por pajueta a través de esta técnica criobiológica reduce considerablemente el tiempo de congelación. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del número de embriones por pajueta sobre la viabilidad morfológica embrionaria post vitricación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se escogieron ratones hembra vírgenes de la cepa NIH, los cuales fueron sometidos al protocolo de superovulación y colecta de embriones descrito por Kuleshova *et al.* (2001), escogiendo de dichas colectas los embriones de calidad excelente siguiendo los parámetros descritos por Lidner y Wright (1983), dividiendo los embriones en 4 grupos, dependiendo del número de embriones alojados en cada pajueta (1, 2, 4 ó 6 embriones por pajueta), los cuales fueron sometidos a la técnica de vitricación pajueta estirada abierta modificada (mOPS) señalado por López-Béjar y López-Gatius (2002). Finalmente, la apariencia morfológica embrionaria post vitricación fue evaluada bajo microscopía de luz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 572 embriones murinos vitricados fueron recuperados 533, no encontrándose diferencia significativa entre los 4 tipos de cargado ($P>0,05$). Con relación al número de embriones cargados por pajueta y la tasa de embriones morfológicamente normales y anormales tampoco se encontraron diferencias ($P>0,05$; Cuadro 1), resaltando el tipo de cargado de 4 embriones por pajueta, el cual presentó la mayor tasa de embriones morfológicamente normales (92,0%) y la menor tasa de anormalidades (7,9%). Estos datos difieren de lo señalado por Kong *et al.* (2000) y Cho *et al.* (2002), quienes reseñan que el número de embriones cargados por pajueta puede afectar significativamente la viabilidad post calentamiento. En la investigación el número de embriones por pajueta no afectó significativamente la sobrevivencia morfológica

en embriones murinos, sin embargo, se sugiere que el tipo de cargado de 4 embriones por pajuela numéricamente es el más eficiente (ver Cuadro).

CUADRO. Número (n) y porcentaje (%) de embriones murinos morfológicamente normales y anormales post vitrificación en pajuelas cargadas con 1, 2, 4 y 6 embriones por pajuela.

Embriones por pajuela (n)	Embriones recuperados (n)	Embriones normales (n; [%])	Embriones anormales (n; [%])
1	42	37 (88,1)	5 (11,9)
2	82	71 (86,5)	11 (13,4)
4	164	151 (92,0)	13 (7,9)
6	245	223 (91,0)	22 (8,9)
Total	533	482 (90,4)	51 (9,5)

BIBLIOGRAFÍA

CHO, S. K., S. G. CHO, I. H. BAE, C. S. PARK and I. K. KONG. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science*. 73:151-158.

KONG, I., S. LEE, S. CHO, S. CHO and C. PARK. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs. glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*. 53:1.817-1.826.

KULESHOVA, L., J. SHAW and A. TROUNSON. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*. 43:21-31.

LIDNER, G. and R. WRIGHT. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20:407-416.

LÓPEZ-BÉJAR, M. and F. LÓPEZ-GATIUS. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*. 58:1.541-1.552.

VAJTA, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*. 60-61:357-364.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMOSIS ANIMAL CAUSADA POR *Trypanosoma evansi*¹

Eglys B. González M.*, Bernardo González***,
Roschman González**, Nancy Linares*****,
Alfredo Mijares*****, Trina Perrone*****, y Marta Mendoza***

RESUMEN

Existen varios métodos para el diagnóstico de la tripanosomosis equina, *Trypanosoma evansi*, cuya sensibilidad varía según la etapa de la enfermedad. Recientemente, métodos moleculares como el PCR, basado en la detección de ADN, han mejorado el diagnóstico de las parasitosis. El objetivo de este trabajo fue estandarizar, comparar y evaluar la técnica de PCR para el diagnóstico de *T. evansi* en un modelo experimental múrido. Para ello, se infectaron ratones con el aislado TEVA1. Luego de 48 (horas) se realizó la evaluación parasitológica por cuantificación de Brener y por la técnica de microhematocrito Woo. Para el diagnóstico molecular se purificó el ADN genómico y se amplificó por PCR, empleando los cebadores específicos para *T. evansi*, ESAG 6/7, TEV1/2 y TBR1/2. Todos los cebadores evaluados rindieron el producto de amplificación esperado, excepto en los animales sanos. Los cebadores ESAG 6/7 presentaron una sensibilidad de 1ng de ADN proveniente de parásitos purificados, y de 10ng para muestras proveniente de sangre completa. Del total de ratones infectados, 47% (n=8) resultaron positivos por el método de Brener, 70% (n=12) por Woo y todos por PCR (100%). Estos resultados demostraron que la PCR es más eficiente y sensible que los métodos parasitológicos para la detección de *T. evansi* en modelo múrido, cuando se presentan parasitemias muy bajas.

Palabras Clave: *Trypanosoma evansi*; diagnóstico; PCR.

1 Financiado por BID-FONACIT. Proyecto N° G-2000001152 y 2004000400

* Estudiante de Doctorado, mención Microbiología, ****Investigadores y *****Profesionales de Apoyo a la Investigación. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). E-mail: gonzalezeglys@yahoo.com

** Tesista de Doctorado. Universidad Central de Venezuela (UCV).

*** Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios (CEBIV). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológico (IDECYT).

RECIBIDO: febrero 20, 2006

**STANDARDIZATION OF A POLIMERASE CHAIN
REACTION TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS
OF ANIMAL TRYPANOSOMIASIS CAUSED BY
*Trypanosoma evansi*¹**

Eglys B. González M.*, Bernardo González*,
Roschman González**, Nancy Linares*****,
Alfredo Mijares*****, Trina Perrone*****, y Marta Mendoza*****

SUMMARY

There are several methods to diagnose this illness, equine trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma evansi* and their sensibility varies depending on the disease stage. Recently, molecular methods, like PCR, based on DNA detection have improved the diagnosis of this disease. The purpose of this work was to standardize, differentiate and evaluate the PCR technique for the diagnosis of *T. evansi* in an experimental murine model. Mice were infected with TEVA1. After 48 hours they were evaluated using the parasitological methods of Brener's quantification and the Woo haematocrit centrifuge technique. For molecular diagnosis, genomic DNA was purified and amplified by PCR using primers specific for *T. evansi*: ESAG 6/7, TEV1/2 y TBR1/2. All primers rendered the expected product of amplification, except when non infected animals were used. Primers ESAG 6/7 showed a sensibility of 1ng using DNA from purified parasites and of 10ng using DNA from whole blood samples. From the total of mice infected, 47% (n=8) were positive by Brener's method, 70% (n=12) by Woo's method, and all (100%) by the PCR technique. This result indicates that the PCR technique is much more efficient and sensitive than the parasitological methods used for diagnosing *T. evansi* in a murine model when there is low concentration of parasites.

Key Words: *Trypanosoma evansi*; diagnosis; PCR.

1 Financiado por BID-FONACIT. Proyecto N° G-2000001152 y 2004000400

* Estudiante de Doctorado, mención Microbiología, ****Investigadores y *****Profesionales de Apoyo a la Investigación. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). E-mail: gonzalezegly@yahoo.com

** Tesista de Doctorado. Universidad Central de Venezuela (UCV).

*** Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios (CEBIV). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológico (IDECYT).

RECIBIDO: febrero 20, 2006

INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis equina causada por *Trypanosoma evansi*, presenta una alta prevalencia en Venezuela. Esta parasitosis produce el deterioro físico y hasta la muerte de los caballos utilizados para el manejo del ganado, generando pérdidas económicas a causa de esta enfermedad.

Estudios realizados en la sabana venezolana indican una seroprevalencia del 81,7% de tripanosomosis equina en caballos de trabajo ganadero (Reyna-Bello *et al.*, 1998). En la fase aguda de la enfermedad se producen altas parasitemias que son detectadas por métodos parasitológicos directos, mientras que en la fase crónica estos pierden sensibilidad debido a las baja parasitemia presente. En esta fase, son más sensibles y precisos los métodos serológicos, basados en la detección de anticuerpos específicos, sin embargo estos no diferencian entre infecciones activas y tratadas y no identifican al patógeno. Recientemente se ha introducido el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para mejorar el diagnóstico de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estandarizar, comparar y evaluar la técnica de PCR para el diagnóstico de *T. evansi* en modelo experimental murido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se inocularon 17 ratones ♀NMRI con 100 parásitos/g peso del aislado TEVA1 (referencia). A las 48 horas post-infección se colectaron muestras de sangre para: 1) evaluar la parasitemia, por observación directa al microscopio óptico (Brener, 1962) y por la técnica de microhematocrito (Woo, 1969); y 2) extraer ADN genómico para realizar el PCR.

Estandarización del PCR para el diagnóstico de *T. evansi*. Se extrajo el ADN usando el Kit comercial Wizard a partir de la capa blanca de 1ml de sangre total y se amplificó por PCR utilizando tres pares de cebadores en un volumen final de reacción de 25 µl conteniendo Buffer 1X, dNTPs 200µM c/u, 300ng de ADN, e individualmente ver Cuadro.

Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los cebadores ESAG 6/7. Se extrajo el ADN de los siguientes parásitos purificados: *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas colossoma*, y de sangre de ratón

infectado con TEVA1. La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría, y se evaluaron concentraciones de 300 a 0,1 ng de ADN por PCR. Se realizó electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa al 2%, teñidos con SYBR-safe™ 1,5X (Molecular Probes), y se visualizaron bajo luz UV.

CUADRO. Condiciones de las distintas mezclas de reacción y del proceso de ciclaje.

Reactivos	TEV 1/2		ESAG 6/7		TBR 1/2		
	Wuyts <i>et al.</i> 1995		Holland <i>et al.</i> 2001		Artama <i>et al.</i> 1992		
MgCl ₂ (mM)	2,0		3,0		1,5		
Taq (Unidades)	2		1,5		1		
Cebador1 (μM)	0,25		0,5		0,4		
Cebador2 (μM)	0,25		0,5		0,4		
Programa (°C x min)							
Desnaturalización	94 x 7		94 x 7		94 x 3		
Desnaturalización	94 x 1		94 x 1		94 x 0,75		
Hibridización	ciclos	58 x 1	30	55 x 1	30	60 x 1	30
Extensión	72 x 1		72 x 1		72 x 0,5		
Extensión	-		72 x 5		72 x 5		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cebadores evaluados amplificaron el ADN de *T. evansi* presente en los controles positivos, y no en los controles negativos. Los cebadores TBR1/2 rindieron un producto de varias bandas y TEV1/2 una banda débil, por lo que se seleccionaron para diagnóstico los cebadores ESAG 6/7 al rendir una banda intensa y clara de ~237pb. Los cebadores seleccionados amplificaron el ADN de aislados provenientes de distintos hospedadores y no amplificaron el ADN proveniente de otros tripanosomatideos, resultando específicos para *T. evansi*. La sensibilidad del PCR mostró un mínimo de ADN detectable correspondiente a 1 ng para parásitos

purificados, y de 10 ng para sangre completa. Cuando se compararon los resultados de PCR *versus* las otras técnicas de detección, se obtuvieron los siguientes resultados:

Método de detección	Brener	Woo	PCR
# de muestras positivas	8	12	17
Prevalencia	47%	70%	100%
Parasitemia (parásitos ml ⁻¹)	10 ⁴ - 10 ⁶	10 ³ - 10 ⁴	< 10 ³

Estos resultados indican que la PCR podría detectar bajas parasitemias presentes en la etapa de prepatencia de esta enfermedad. Sin embargo, en los casos donde la parasitemia era muy baja o indetectable por las técnicas parasitológicas fue necesario incrementar la cantidad de ADN genómico a amplificar, para obtener 100% de sensibilidad en el ensayo molecular. Esto se debe a la disminución del número de parásitos por volumen de sangre evaluada. Estos resultados indican que los cebadores ESAG 6/7 podrían ser considerados como candidatos en la estandarización de una técnica de detección múltiple en animales de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARTAMA, W. T., M. W. AGEY and J. E. DONELSON. 1991. DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitology*. 104:67-74.
- BRENER, Z. 1962. Therapeutic activity and criteria of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 4:389-396.
- HOLLAND, W. G., F. CLAES, L. N. MY, N. G. THANH, P. T. TAM, D. VERLOO, P. BÜSCHER, B. GODDEERIES and J. VERCRUYSE. 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*. 97:23-33.

REYNA-BELLO A., F. GARCÍA, M. RIVERA, B. SANZO and P.M. ASO. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary Parasitology*. 80:149-157.

WOO, P. T. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*. 47:921-923.

WUYTS, N., N. CHOKESAJJAWATEE, N. SARATAPHAN and S. PANYIM. 1995. PCR amplification of crude blood of microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*. 75:229-237.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA Y OVINA¹

Lucinda Tavares-Marques* y Armando Reyna-Bello*

RESUMEN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por *Anaplasma marginale* (*A. marginale*), bacteria intraeritrocítica clasificada dentro de las α -proteobacterias. En Venezuela, 47,6% del ganado bovino se encuentra afectado por esta enfermedad, ocasionando grandes pérdidas en estos rebaños; sin embargo, se desconoce la incidencia de esta enfermedad en el ganado ovino. El objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de PCR para la detección de *A. marginale* en muestras de sangre de bovinos y ovinos. Para esto, se utilizaron dos iniciadores Ana19A y Ana19B específicos para amplificar el gen de la proteína MSP5 de *A. marginale*. Con la finalidad de probar el PCR estandarizado, se analizaron muestras de sangre bovina provenientes de una zona endémica, resultando positivos el 40% de las muestras. En el caso de los ovinos, un 25% de las muestras analizadas resultaron positivas. En conclusión, la técnica demostró su versatilidad en la detección de *Anaplasma* sp., y además de ello, se constató la presencia de esta rickettsia en ovinos de Venezuela, lo que hasta el presente no había sido determinada por métodos moleculares.

Palabras Clave: *Anaplasma marginale*; PCR; anaplasmosis bovina; anaplasmosis ovina.

1 Trabajo financiado por el proyecto G-98003462 del FONACIT y G-2004000400 del BID-FONACIT.

* Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT. Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Laboratorio de Inmunobiología. Apdo. Postal 47925, Caracas 1041. Venezuela. E-mail: areyna@inmunobiologia.net.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

STANDARDIZATION OF PCR TECHNIQUE FOR DIAGNOSIS OF BOVINE AND OVINE ANAPLASMOSIS¹

Lucinda Tavares-Marques* y Armando Reyna-Bello*

SUMMARY

Bovine anaplasmosis is a disease caused by *Anaplasma marginale* (*A. marginale*), an intra erythrocytic bacteria classified within the α -proteobacterias. In Venezuela, 46% of cattle are infected with this disease producing major herd losses. However, incidence of the disease in sheep is unknown. The objective of this work was to standardize the PCR technique for the detection of *A. marginale* in bovine and sheep blood. Ana19A and Ana19B specific primers were used to amplify the gene of Major Surface Protein 5 (MSP5). With the purpose of evaluating the standardized technique, bovine blood samples from an endemic zone were analyzed, resulting positive 40% of them. With respect to ovines, 25% of samples analyzed were positive. In conclusion, this technique has shown its versatility in the detection of *Anaplasma* sp. Another important aspect is that these results show the presence of MSP5 gene from *Anaplasma* sp. on small Venezuela's ruminants, which before had not been determined by molecular methods.

Key Words: *Anaplasma marginale*; PCR; bovine anaplasmosis; ovine anaplasmosis.

¹ Trabajo financiado por el proyecto G-98003462 del FONACIT y G-2004000400 del BID-FONACIT.

* Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT. Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Laboratorio de Inmunobiología. Apdo. Postal 47925, Caracas 1041. Venezuela. E-mail: areyna@inmunobiologia.net.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis es una enfermedad causada por la bacteria *Anaplasma marginale* clasificada en el grupo de las α -proteobacterias, Orden *Rickettsiales* (Dumler *et al.*, 2001). Esta bacteria puede afectar a grandes y pequeños rumiantes, manifestándose por anemia progresiva que puede variar de ligera a severa junto con la aparición de cuerpos intraeritrocíticos. En Venezuela, 47,6% del ganado es seropositivo a *A. marginale*, estimándose así un alto porcentaje de pérdida de producción bovina e incluso a veces por la muerte de los animales afectados (Rivera, 1996).

Estudios preliminares de esta enfermedad en ovinos, han demostrado una seroprevalencia al sur del estado Guárico de un 80,46%. Sin embargo, se desconocen las pérdidas que pudiera ocasionar esta infección en los pequeños rumiantes (Tavares *et al.*, 2004). El objetivo de este trabajo fue realizar la estandarización de la técnica de PCR, para la detección directa de *A. marginale* en sangre tanto en bovinos como en ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Controles utilizados: Con la finalidad de estandarizar el PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, se utilizaron tres muestras. La primera, provino de la extracción de ADN de cuerpos de *Anaplasma marginale* como control positivo, la segunda y tercera provinieron de una extracción de ADN de sangre de un animal infectado y otro negativo, como control positivo y negativo, respectivamente. Todos estos animales fueron diagnosticados anteriormente por ELISA como positivos (Eleizalde *et al.*, 2003).

Para la estandarización de la prueba utilizando ADN a partir de sangre de ovinos, se emplearon tres muestras, además de las anteriormente mencionadas, para la estandarización en el PCR de bovinos como control positivo y negativo.

También se emplearon para probar la prueba de PCR, 5 muestras de bovinos y 4 de ovinos, provenientes de una zona endémica.

Prueba de PCR: El protocolo de extracción de ADN que se utilizó a partir de sangre fue el propuesto por un estuche comercial (Promega, DNA Purification, cat. N° A1120). Para el control positivo de ADN de *A.*

marginale, se utilizaron cuerpos iniciales de esta rickettsia, purificados a partir de un bovino infectado experimentalmente y luego se purificó el ADN siguiendo el protocolo descrito por Reyna Bello (2001). Luego de extraer el ADN a partir de sangre y de cuerpos de *A. marginale*, se procedió entonces a realizar la estandarización para el diagnóstico de *Anaplasma* sp. Los cebadores utilizados para estos PCR fueron Ana19A y Ana19B señalados por Reyna-Bello *et al.* (1998) como iniciadores específicos para amplificar el gen de la proteína MSP5 de *A. marginale*.

La prueba de PCR fue realizada con 40 ciclos, utilizando primeramente 94 °C de desnaturalización, 62 ó 64 °C de alineamiento y 70 °C para la extensión (Cuadro 1).

CUADRO 1. Temperaturas programadas en el termociclador para la amplificación del gen de la MSP5 de *A. marginale*.

Temperaturas y ciclos para la prueba de PCR			
Ciclo	Veces	Temperatura	Tiempo
1	1	94 °C	5 min
2	40	94 °C	30 seg.
		62 ó 64 °C	30 seg.
		70 °C	30 seg.
3	1	70 °C	10 min
4	1	4 °C	Infinito

Para la estandarización del PCR en bovinos, se utilizaron las siguientes diluciones de ADN: 1) ADN purificado a partir de cuerpos de *A. marginale* 1:80, 2 y 3) controles bovinos negativo y positivo 1:8; todas estas frente a 3 diluciones de MgCl₂: 2,5 mM, 3mM y 3,5 mM. El resto de los reactivos utilizados fueron: Buffer Taq 1X, dNTP's 800 uM, cebador directo y reverso 1 mM y Taq 1,25 unid/25 µl. Para esto, se utilizaron dos protocolos, uno con temperatura de alineamiento de 62 °C y otro con temperatura de alineamiento de 64 °C (Torioni *et al.*, 1998; Reyna-Bello

et al., 1998) señalado en el Cuadro 2. Posteriormente, se aisló el ADN total de 3 ovinos y se realizó el PCR con las diluciones 1:2 y 1:8 de las muestras, utilizando un estuche comercial (Promega, Master Mix, Cat. N° M750B), tal como se observa en el Cuadro 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CUADRO 2. Estandarización de PCR para el diagnóstico de anaplasmosis en bovinos.

Prueba de PCR para la anaplasmosis bovina	
Diluciones de muestras de ADN <i>A. marginale</i>	Control ADN de <i>A. marginale</i> 1:80 Control bovino negativo 1:8 Control bovino positivo 1:8
Concentración $MgCl_2$	2,5 mM 3 mM 3,5 mM
Temperatura de alineamiento	62 °C 64 °C

CUADRO 3. Estandarización de PCR para el diagnóstico de anaplasmosis en ovinos.

Prueba de PCR para la anaplasmosis ovina	
Control ADN de <i>A. marginale</i>	Control ADN de <i>A. marginale</i> 1:80
Diluciones de las tres muestras provenientes de ovinos	1:2 y 1:8
Temperatura de alineamiento	64 °C

Los resultados sugieren que las condiciones óptimas para el PCR en ADN de bovinos fueron: 1) 64 °C de alineamiento ya que a 62 °C se observaron reacciones inespecíficas (resultados no mostrados), 2) 3 mM de MgCl₂ debido a que la condición 2,5 mM de MgCl₂ resultaba en una amplificación débil y la de 3,5 mM de MgCl₂ presentaba una amplificación fuerte con amplicones inespecíficos, (Figuras 1, 3) las diluciones óptimas para el diagnóstico de *Anaplasma marginale* en bovinos fueron: control de ADN proveniente de cuerpos de *A. marginale* 1:80, muestras de ADN extraídas a partir de sangre de animales problema 1:8.

Para el caso de los ovinos, se determinó que la dilución óptima de las muestras de ADN debe ser 1:2, a fin de evitar la aparición de ampliificaciones inespecíficas (Figura 2).

Con el fin de evaluar el PCR estandarizado con las temperaturas anteriormente expuestas, se utilizaron cinco muestras de ADN bovinos obtenidas de una zona endémica, resultando positivos dos animales de la población muestreada (Figura 3). En el caso de los ovinos, se utilizaron cuatro muestras de ADN, resultando positiva una sola muestra (Figura 4).

En todos los casos que hubo amplificación, se observó una banda única de aproximadamente 806 pares de bases, de manera similar a lo obtenido por Visser *et al.* (1992); Reyna-Bello *et al.* (1998).

El diagnóstico de la anaplasmosis bovina u ovina puede realizarse fácilmente en casos agudos, debido a las altas ricketsemias que pueden ser observadas en extendidos sanguíneos. No obstante, cuando los animales están en estado crónico de la enfermedad, es muy difícil distinguir si lo que se observa en los frotis son o no cuerpos de inclusión de *Anaplasma* sp. En estos casos se deben emplear otros métodos que permitan un diagnóstico más preciso y certero aún cuando los ciclos de ricketsemias son imperceptibles en extendidos sanguíneos (French *et al.*, 1998 y 1999). Es por ello que la prueba de PCR presentada en este trabajo, puede constituir en Venezuela una prueba de referencia para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina.

Hasta el presente, no existen estudios de la presencia de *Anaplasma* sp. en ovinos de Venezuela. Trabajos previos realizados por Tavares *et al.*,

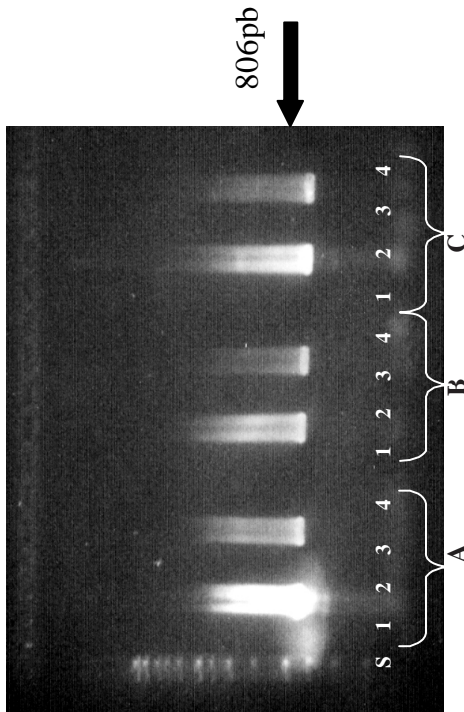


FIGURA 1. Estandarización de PCR para el diagnóstico de *Anaplasma* sp., en bovinos. Carriles: 1) Control ADN *A. marginale* 1/80, 2) Control negativo 1/8; 3) Rumiante positivo 1/8; 4) Agua. A) 2,5 mM de MgCl₂; B) mM de MgCl₂; C) 3,5 mM de MgCl₂. S: Estándar de peso de 1 kb.

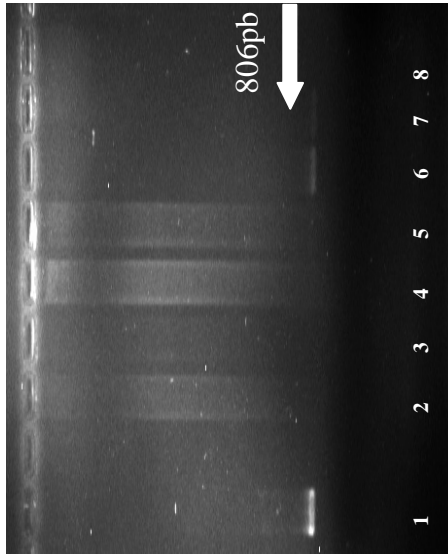


FIGURA 2. Estandarización de PCR para el diagnóstico de *Anaplasma* sp. en ovinos. Carriles: 1) ADN de cuervos de *A. marginale*, 2) Muestra 1 dilución 1/2, 3) Muestra 1 dilución 1/8, 4) Muestra 2 dilución 1/2, 5) Muestra 2 dilución 1/8, 6) Muestra 3 dilución 1/2, 7) Muestra 3 dilución 1/8, 8) Agua.

FIGURAS 1 y 2. Geles de agarosa al 2% en solución tampón TAE (Tris 0,03M, Ácido acético 0,02M, EDTA 0,1M pH 8) teñidos con 0m016% de Bromuro de etidio.

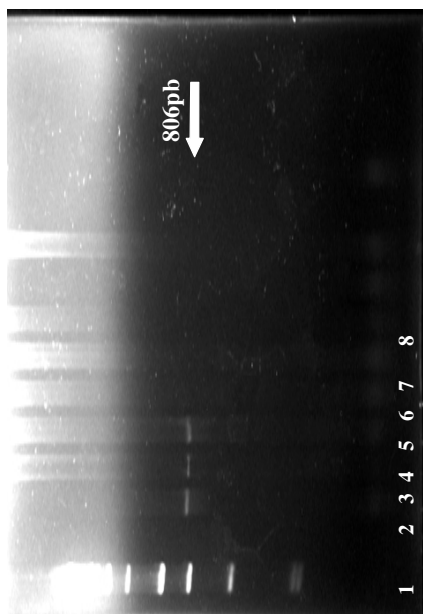


FIGURA 3. PCR de población de bovinos para el diagnóstico *A. marginale*. Carriles: 1) Estándar de 1kb, 2) ADN de cuerpos de *A. marginale* purificados, 3-7) Muestras de ADN bovino diluidas 1/8 y carril 8) Agua.

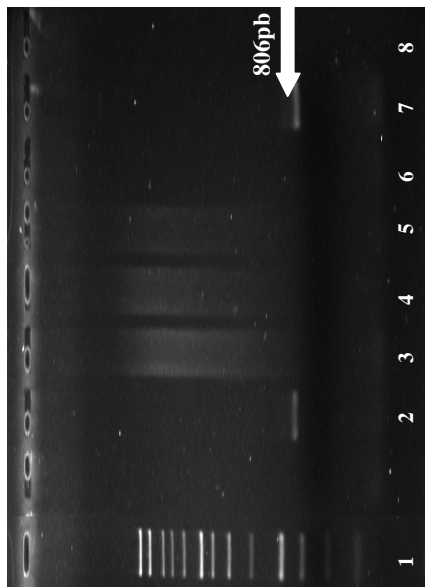


FIGURA 4. PCR de población de ovinos para el diagnóstico *A. marginale*. Carriles: 1) Estándar de 1kb, 2) ADN de cuerpos de *A. marginale* dilución 1/8, 3) Control negativo, 4-7) Muestras de ADN ovinos dilución 1/2 y carril 8) Agua.

FIGURAS 3 y 4. Geles de agarosa al 2% en solución tampón TAE (Tris 0,03M, Ácido acético 0,02M, EDTA 0,1M pH 8) teñidos con 0m016% de Bromuro de etidio.

2004, determinaron la presencia de anticuerpos anti-MSP5 en ovinos venezolanos. Es importante destacar que esta es la primera vez que se demuestra por métodos moleculares, la presencia de *Anaplasma* sp. en pequeños rumiantes de Latinoamérica. Lo cual reviste gran importancia, pues esto agrega un nuevo factor a los estudios epidemiológicos de la anaplasmosis bovina, debido que quizás los pequeños rumiantes estén actuando como reservorio de esta enfermedad. Sin embargo, se requiere ahondar en estudios moleculares para identificar si los pequeños rumiantes están siendo afectados por *A. marginale* o *A. ovis*, trabajos que deberían ser acompañados con estudios sobre las posibles patologías de estas bacterias en los ovinos.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen la labor de Xiomara Ortega por su asistencia técnica en el laboratorio de Inmunobiología y a Jairo González por su colaboración en el mantenimiento de los animales experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

DUMLER, S., A. BARBET, C. BEKKER, G. DASH, G. PALMER, S. RAY, R. YASUKO and F. RURANGIRWA. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:2 145-2 165.

ELEIZALDE, M. C., H. CABALLERO, J. VIVAS y A. REYNA-BELLO. 2003. Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. **In:** LIII Convención Anual de ASOVAC. Maracaibo-Venezuela. 24-28 noviembre Acta Científ Ven. 54 (Sup. 1):279 p.

FRENCH, D. M., W. C. BROWN and G. H. PALMER. 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun.* 67(11):5 834-5 840.

FRENCH, D. M., T. F. MCELWAIN, T. C. McGUIRE and G. H. PALMER. 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface

protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun.* 66(3):1 200-1 207.

RIVERA, M. 1996. Hemoparasitosis Bovinas. Ed Anaucó ediciones, C. A. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

REYNA BELLO, A. 2001. Etude des antigènes de *Anaplasma marginale* et développement d'une épreuve Immuno-enzymatique pour le diagnostique de l'anaplasmose bovine. Tesis para optar por el título de Doctor. Université d'Orléans.

REYNA-BELLO, A., M. I. GONZATTI, P. M. ASO, A. CLOECKAERT, N. VIZCAÍNO, G. DUBRAY and M. S. ZYGMUNT 1998. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela. *Clin. Diag. Lab. Immunol* 5(2):259-262.

TAVARES, L., C. NÚÑEZ y A. REYNA-BELLO. 2004. "Estandarización de un ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de la anaplasmosis en pequeños rumiantes de la Estación Experimental La Iguana". I Simposio Internacional. **In:** II Simposio Nacional: Hemoparásitos y Sus vectores". Caracas-Venezuela, del 14 al 16 de Octubre. 25 p.

TORIONI de ECHAIDE, S., D. KNOWLES, T. McGUIRE, G. PALMER, C. SUAREZ and T. MCELWAIN. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5. *The J Clin Microbiol.* 36(3):777-782.

VISSER, E. S., T. C. McGUIRE, G. H. PALMER, W. C. DAVIS, V. SHKAP, E. PIPANO et D. P. KNOWLES, Jr. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60(5):1 139-5 144.

Especialidad Procesos Industriales

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL DE VARIETADES *Phaseolus vulgaris* CULTIVADAS EN VENEZUELA

Marisela Granito*, Julieta Guinand** y Delis Pérez**

RESUMEN

Phaseolus vulgaris es una importante fuente de nutrimentos que además forma parte de los hábitos alimenticios de la población venezolana. En Venezuela existen las condiciones climáticas y agronómicas para su cultivo, sin embargo, para poder cubrir la demanda de este alimento hay que recurrir a las importaciones. A fin de minimizar esta dependencia, es necesario tomar una serie de medidas, entre otras el desarrollo de semilla certificada y de calidad. El objetivo de este trabajo fue la caracterización química y nutricional, de semillas de caraota genéticamente mejoradas, provenientes del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) Maracay. Nueve variedades de *P. vulgaris* fueron analizadas en cuanto a humedad, proteína, grasa, cenizas, minerales y polifenoles siguiendo las metodologías descritas en el AOAC. Para la determinación de almidones totales y disponibles se utilizó la metodología descrita por Holm *et al.*; para los almidones resistentes la de Champ *et al.* y taninos por Naczek *et al.* Se encontraron valores promedios de humedad de 9,72%, proteína 29,25%, grasa 2,44% y cenizas de 4,35%. Respecto a los minerales se cuantificaron calcio (197,86 mg 100gbs⁻¹), sodio (67,56 mg 100gbs⁻¹), magnesio (219,49 mg 100gbs⁻¹), hierro (6,02 mg 100gbs⁻¹), fósforo (546,75 mg 100gbs⁻¹), potasio (1 436,11 mg 100gbs⁻¹), zinc (2,62 mg 100gbs⁻¹), almidón total (43,88%), almidón disponible (38,99%), almidón resistente (25,48%), polifenoles (846 mg 100gbs⁻¹) y taninos (40,91 mg 100gbs⁻¹). De los resultados encontrados se puede concluir que existe una gran variabilidad tanto en nutrimentos como en componentes bioactivos entre las variedades analizadas y que éstas podrían representar una importante fuente de nutrimentos para la dieta del venezolano.

Palabras Clave: Caraota; *Phaseolus vulgaris*; composición; química; nutricional.

* Profesor. Universidad Simón Bolívar. Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Apdo. 1090A. Caracas. Venezuela.

** Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Zona Universitaria. Av. Universidad, vía El Limón. Apdo. 4653. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

CHEMICAL AND NUTRITIONAL COMPOSITION OF VENEZUELAN *Phaseolus vulgaris* CULTIVATED VARIETIES

Marisela Granito*, Julieta Guinand* y Delis Pérez**

SUMMARY

Phaseolus vulgaris is an important source of nutrients that is part of the staple diet of the Venezuelan population. Although there are adequate agroclimatic conditions for its growth in the country, Venezuela must import this foodstuff to meet the demand. The reasons for this fact are multiple, among which, the lack of certified and quality seeds could be pointed out. The objective of this work was the chemical and nutritional characterization of genetically improved black beans from the germplasm bank of the Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay. Nine varieties of *P. vulgaris* were analyzed regarding moisture, protein, fat, ash, minerals and polyphenol, following the methodologies described in the AOAC. To determine total and available starch the methodology of Holm *et al.*, was used, for resistant starch Champ *et al.* was applied and tannins were determined by Naczek *et al.* Average values found were of 29,95% for protein, 2,44% for fat, 4,35% for ash, 43,88% of total starch, 38,99% of available starch, 25,48% of resistant starch, 846 mg 100gbs⁻¹ of polyphenols and 40,91 mg 100gbs⁻¹ of tannins. From these results, it was concluded that among the varieties characterized, there is a great variability of both nutrients and bioactive components, which suggests an important source of nutrients that may contribute to the diversification of the diet of Venezuelans.

Key Words: *Phaseolus vulgaris*; chemical composition; nutritional composition.

* Profesor. Universidad Simón Bolívar. Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Apdo. 1090A. Caracas. Venezuela.

** Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Zona Universitaria. Av. Universidad, vía El Limón. Apdo. 4653. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las “caraotas negras”, como se le conoce a los frijoles negros, *Phaseolus vulgaris* en Venezuela, constituyen un componente fundamental en la dieta de muchas poblaciones y su valioso contenido en proteínas, minerales como el hierro, calcio y zinc, polifenoles, α -galactósidos y fibra soluble, hacen de ellas un alimento beneficioso para la salud (Granito *et al.*, 2002; Champ, 2002).

En Venezuela, las caraotas negras forman parte importante de los hábitos alimenticios de la población siendo en orden de consumo el sexto alimento más consumido; se consumen aproximadamente 20g por persona/día. (Mercado y Lorenzana, 2000). El uso de la caraota en Venezuela es básicamente en forma de grano integral en numerosos platos como el típico “Pabellón criollo”, las “caraotas refritas”, entre otros. La elevada demanda y la poca producción interna de este rubro hace necesario recurrir a la importación para satisfacer las necesidades de consumo (MAC, 2000), sin embargo, son varias las zonas del país donde las condiciones climáticas favorecen la siembra de caraotas negras, por lo que es importante contar con semilla certificada de buena calidad e incentivos financieros, que hagan de este cultivo un rubro atractivo para comercializar.

El objetivo de esta investigación fue cuantificar la composición química y nutricional de variedades mejoradas de caraota del banco de germoplasma del INIA, a fin de identificar fuentes de alta calidad nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron nueve variedades de *P. vulgaris* (NAG-Sanare, NAG-75, MGM-0802010, MDG-01-99-014, AB-02-01-010, MEM-01-00-028, MEM-03-02-002, MEM-01-00-006, MEM-03-01-013) suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIA-Maracay).

Preparación de las muestras

La toma de muestra se realizó siguiendo la metodología expuesta en la Norma Covenin N° 0612-82 (COVENIN, 1982). Las muestras crudas se molieron en un molino Marca Analizar, Modelo MC-II; posteriormente

se cernieron utilizando un tamiz de 40 mesh para los análisis de humedad, proteínas, grasa, cenizas y minerales y de 80 mesh para polifenoles y taninos.

Métodos analíticos

Todos los análisis se realizaron por triplicado

Humedad: La determinación de humedad se realizó utilizando la metodología por pérdida de peso indicada en la norma Covenin N° 1153-80 (COVENIN, 1980).

Proteína Total: El contenido de nitrógeno total fue determinado de acuerdo al método 960.52 (AOAC, 1990), utilizándose un factor de conversión de 6,25.

Grasa: método 920.39 (AOAC, 1990).

Cenizas: método 923.03 (AOAC, 1990).

Determinación de minerales: los minerales analizados fueron: calcio, sodio, magnesio, hierro, fósforo, potasio y zinc. Se determinaron utilizando Espectroscopía de Emisión Atómica con un equipo Ar Spectroflame D (Ar ICP) a partir del residuo de cenizas disuelto en ácido. Se empleó el método 984.27 (AOAC, 1990).

Polifenoles: la determinación de polifenoles se realizó a través del método colorimétrico de Folin y Dennis (AOAC, 1990) empleando el reactivo de Folin Ciocalteu.

Taninos: se cuantificaron según el método de Naczka *et al.* (1994).

Almidón total y disponible: se realizó empleando el método de Holm *et al.* (1986), modificado por Tovar *et al.* (1990).

Almidón resistente: se cuantificó utilizando el método de Champ *et al.* (1995).

Análisis estadísticos: Todos los resultados fueron expresados como la media de tres determinaciones y su desviación estándar. Se aplicó ANOVA y Test de Duncan a toda la data utilizando el programa Statgraphic Statistical Graphics 4,0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se presentan los contenidos de humedad, proteína, grasa y cenizas. Se observa para todos los análisis diferencias estadísticamente significativas entre varias de las muestras ($P < 0,05$). En relación al contenido proteico, se encontró un rango de contenidos entre 27,48% (variedad AB0201010) y 31,39% (variedad MGM 0802010) siendo el promedio de 29,25%. Si se comparan estos resultados con los señalados por Sathe *et al.* (1984), Granito *et al.* (2002) e INN (1999), los cuales se encuentran en un rango entre 22,4 y 26,1%, se puede concluir que el contenido proteico de las muestras analizadas fue 12,5% superior al presentado en la bibliografía.

En cuanto al contenido de grasa el valor promedio fue de 2,44%, superior en un 50% a los observados por Granito *et al.* (2002) y Santalla *et al.* (1999). La variedad que presentó el mayor contenido de este nutrimento fue NAG-75. El contenido de cenizas promedio fue de 4,35%, similar al mostrado en la bibliografía (Granito *et al.*, 2002; INN, 1999), encontrándose el máximo valor (4,74%) para la variedad MGM-0802010.

CUADRO 1. Contenido de humedad, proteína, grasa y ceniza de variedades *Phaseolus vulgaris**

Variedad	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)
NAG-Sanare	9,76±0,17 ^c	30,66±0,16 ^d	1,52±0,05 ^b	4,14±0,06 ^a
NAG-75	10±0 ^c	28,55±0,12 ^{ab}	3,86±0,11 ^f	4,14±0,07 ^a
MGM-0802010	8,25±0,1 ^a	31,39±0,08 ^d	2,20±0,09 ^c	4,74±0,12 ^c
MDG-01-99-014	10,91±0,09 ^e	28,36±0,19 ^a	1,65±0,03 ^b	4,34±0,05 ^{ab}
AB-02-01-010	8,86±0,08 ^b	27,48±0,11 ^a	1,36±0,00 ^a	4,50±0,12 ^b
MEM-01-00-028	11,68±0,2 ^f	29,43±0,01 ^c	2,47±0,10 ^c	4,22±0,05 ^a
MEM-03-02-002	9,27±0,18 ^b	28,70±0,31 ^b	3,46±0,04 ^e	4,49±0,02 ^b
MEM-01-00-006	10,40±0,2 ^d	28,66±0,13 ^b	2,68±0,09 ^d	4,44±0,10 ^b
MEM-03-01-013	8,31±0,01 ^a	29,98±0,13 ^c	2,76±0,15 ^d	4,12±0,04 ^a

*Resultados de proteína, grasa y ceniza están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

En relación al contenido de almidones totales, disponibles y resistentes (Cuadro 2), la variabilidad cuantificada fue alta. Todas las muestras analizadas difirieron significativamente ($P < 0,05$), encontrándose promedios de 43,88%, 38,99% y 25,48% para los almidones totales, disponibles y resistentes.

La variedad MEM0302002 fue la que presentó contenidos mayores de las tres fracciones de almidones. Resultados similares para almidón total en *P. vulgaris* han sido estudiados por Candela *et al.* (1997); sin embargo, las variedades analizadas muestran valores superiores en 18,40% para almidón total, 55,21% para almidón disponible y 113,40% para almidón resistente que los señalados por Granito *et al.* (2002).

El contenido de polifenoles totales y taninos de las variedades analizadas se presentan en el Cuadro 2. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre todas las muestras.

El contenido promedio de polifenoles fue de 846 mg/100gbs similar al encontrado por Kadam *et al.* (1985). Las variedades MDG-0199014, MEM-0100006 y MEM-0100028 presentaron los valores más bajos; 379,61 mg 100g⁻¹, 470,52 mg 100g⁻¹ y 501,18 mg 100g⁻¹, respectivamente.

El contenido promedio de taninos fue de 40,91 mg/100 gbs, 54,43% menor que el presentado por Dávila *et al.* (2003). Cabe destacar el alto contenido de polifenoles totales de la variedad NAG-Sanare de 1 342,12 mg 100g⁻¹ donde predominaban las fracciones 1 y 2 de mayor actividad antioxidante y su relativo bajo contenido de taninos (11,93 mg 100g⁻¹), importante factor antinutricional naturalmente presente en las caraotas. Por otra parte se encontró que las variedades NAG-Sanare y NAG-75 presentaron los menores valores de taninos, 11,93 mg 100g⁻¹ y 8,61 mg 100g⁻¹.

En el Cuadro 3 se muestra el contenido de minerales. Se observa diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para todos los elementos analizados en algunas de las variedades. Es de destacar el alto valor de calcio encontrado para la variedad MEM-03-02-002 y de hierro para la variedad NAG-75. En general, los resultados encontrados para Ca, Na, Mg, Fe, K y Zn fueron similares a los estudiados por Granito *et al.* (2002).

CUADRO 2. Contenido de almidón total, almidón disponible, almidón resistente, polifenoles, polifenoles y taninos en *Phaseolus vulgaris*.*

Variiedad	Almidón total (%)	Almidón disponible (%)	Almidón resistente (%)	Polifenoles (mg* 100g ⁻¹)	Taninos (mg* 100g ⁻¹)
NAG-Sanare	41,30 ± 0,35 ^a	40,05 ± 0,65 ^c	24,57 ± 0,51 ^{bc}	1 342,12 ± 7,10 ^h	11,93 ± 0,08 ^b
NAG-75	44,60 ± 0,18 ^e	38,30 ± 1,48 ^b	26,38 ± 0,42 ^d	961,76 ± 13 ^f	8,61 ± 0,04 ^a
MGM-0802010	41,92 ± 1,61 ^{ab}	41,90 ± 0,20 ^d	21,03 ± 2,41 ^a	1 403,09 ± 9,85 ⁱ	47,52 ± 2,06 ^f
MDG-01-99-014	46,38 ± 0,27 ^f	36,30 ± 1,35 ^a	26,60 ± 1,48 ^{de}	379,61 ± 9,09 ^a	26,51 ± 0,04 ^d
AB-02-01-010	43,75 ± 0,44 ^{cde}	38,53 ± 0,67 ^b	25,22 ± 0,37 ^{bc}	639,98 ± 7,92 ^d	166,78 ± 3,10 ^h
MEM-01-00-028	42,54 ± 2,24 ^{bc}	38,40 ± 0,34 ^b	24,34 ± 0,65 ^b	501,18 ± 1,41 ^c	32,76 ± 2,95 ^e
MEM-03-02-002	47,32 ± 1,78 ^f	39,84 ± 0,99 ^c	26,31 ± 0,93 ^d	1 225,13 ± 1,85 ^g	50,69 ± 2,60 ^g
MEM-01-00-006	42,93 ± 0,64 ^{bcd}	38,58 ± 0,81 ^b	27,91 ± 2,05 ^e	470,52 ± 10,40 ^b	26,29 ± 0,01 ^d
MEM-03-01-013	44,17 ± 0,16 ^{de}	39,07 ± 0,14 ^c	26,95 ± 1,49 ^{de}	688,35 ± 4,52 ^e	24,70 ± 0,04

* mg de ácido tánico. Los resultados están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

CUADRO 3. Contenido de minerales de variedades *Phaseolus vulgaris**

Variación	Ca (mg 100g ⁻¹)	Na (mg 100g ⁻¹)	Mg (mg 100g ⁻¹)	Fe (mg 100g ⁻¹)	K (mg 100g ⁻¹)	Zn (mg 100g ⁻¹)
NAG-Sanare	161,95±4,43 ^a	60,44±6,24 ^e	218,57±4,28 ^b	6,45±0,20 ^c	1 125±31 ^c	—
NAG-75	194±20 ^c	25,95±3,28 ^c	218,28±14 ^b	8,27±1,07 ^d	956,21±24,34 ^b	—
MGM-0802010	203,89±0,70 ^c	14,67±0,57 ^a	220,97±2 ^b	6,16±0,29 ^c	1 683±22 ^b	2,84±0,04 ^c
MDG-01-99-014	222,93±8,74 ^d	104,46±5,68 ^e	229,84±2,13 ^c	4,2±0,3 ^a	1 479,92±88,37 ^d	2,48±0,06 ^{ab}
AB-02-01-010	157,24±3,72 ^a	79,84±0,64 ^f	194,33±1,02 ^a	5,49±0,09 ^b	1 664,44±73,32 ^e	2,60±0,17 ^b
MEM-01-00-028	178,83±2,56 ^b	28,86±1,25 ^d	205,06±5,66 ^a	3,97±0,24 ^a	1 522,11±20,15 ^e	2,58±0,45 ^b
MEM-03-02-002	249,19±2,54 ^f	129,5±0,05 ^b	229,29±2,66 ^c	6,34±0,14 ^c	1 485,01±31,05 ^d	2,99±0,18 ^c
MEM-01-00-006	231,83±0,82 ^e	17,35±0,74 ^b	222,57±6,17 ^b	5,63±0 ^b	1 591,05±9,26 ^f	2,24±0,03 ^a
MEM-03-01-013	180,02±5,49 ^b	82,89±0,24 ^f	236,50±0,66 ^d	7,67±0,08 ^d	1 418,21±5,01 ^a	2,61±0,09 ^b

* Los resultados están expresados en base seca. Letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

- De las variedades analizadas, MGM-080210 y MEM-0302002 fueron las que presentaron una mejor calidad nutricional debido a su alto contenido de proteína, almidones disponibles, calcio, sodio, magnesio, potasio y zinc.
- En relación a los factores antinutricionales, las variedades MDG-0199014, MEM-0100006 y MEM-0100028 presentaron los valores más bajos de polifenoles y taninos.
- Los resultados encontrados ponen en evidencia la gran variabilidad química de las variedades analizadas, lo cual podría redundar en una diversificación de uso de las carautas y por ende en una contribución al mejoramiento de la calidad nutricional de la ingesta de la población.

BIBLIOGRAFÍA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1990. 15th edn. AOAC, Washington, DC, pp 152-169.

CANDELA, M., I. ASTIASARAN and J. BELLO. 1997. Cooking and warm-holding: effect on general composition and amino acids of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), Chickpeas (*Cicer arietinum*), and Lentils (*Lens culinaris*). *J. Agric. Food Chem.* 45:4.763-4.767.

CHAMP, M. 2002. Grain legumes and health- a workshop in 2001. *Grain Legumes.* 35:13-14.

CHAMP, M., L. NOAH, G. LOIZEAU and F. KOZLOWSKI. 1995. Analytical methods of resistant starch. **In:** Proceeding of the AOAC International Workshop "Definition and analysis of complex carbohydrates / dietary fiber", Nashville, Tennessee, USA.

COVENIN. 1980. Norma N° 1553-80. Alimentos. Determinación de humedad. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Editado por Fondonorma. Caracas, Venezuela.

COVENIN. 1982. Norma N° 0612:1982. Cereales, leguminosas, oleaginosas y productos derivados. Muestreo. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Editado por Fondonorma. Caracas, Venezuela.

DÁVILA, M., E. SANGRONIS y M. GRANITO. 2003. Leguminosas

germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. , Vol. 53, N° 4.

GRANITO, M., J. FRÍAS, R. DOBLADO, M. GUERRA, M. CHAMP and C. VIDAL-VALVERDE. 2002. Nutricional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. Eur. Food Res. Technol. 214: 226-231.

HOLM, J., I. BJORCK, A. DREWS and N. G. Asp. 1986. A rapid method for the analysis of starch. Starch/Staerke 38:224-226.

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN (INN). 1999. Tabla de Composición de Alimentos para Uso Práctico. Caracas. p: 46-47. (Publicación N° 54. Serie Cuadernos Azules).

KADAM, S. S., D. K. SALUNKE and J. MAGA. 1985. Nutricional composition in processing and utilization of horse grain and north bean. Critical Reviews in Nutrition and Food Science. Vol.22. Issue 1: 9.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC). 2000. Anuario Estadístico Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Cría. Oficina sectorial de planificación agrícola. Dirección de Estadística e Informática. Caracas-Venezuela.

MERCADO, C. E. P. y P. LORENZANA. 2000. Acceso y Disponibilidad Alimentaria Familiar: validación de instrumentos para su medición. Fundación Polar. Primera Edición, Caracas-Venezuela.

NACZK, M., T. NICHOLS, D. PINK and F. SOSULSKI. 1994. Condensed tannin in canolla hulls. J. Agric. Food Chem. 42:2 196-2 200.

SANTALLA, M., M. ANGELO, P. RODINO, I. MONTERO and RON. A. 1999. Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in intercropping systems with maize (*Zea mays*). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 3(4):225-229.

TOVAR, J., I. BJORCK and N. G. ASP. 1990. Starch content and α -amylolysis rate in precooked legumes flour. J. Agric. Food Chem. 38: 1 818-1 823.

α -GALACTÓSIDOS Y FITATOS EN SEMILLAS GERMINADAS DE *Phaseolus vulgaris* Y DE *Vigna sinensis*

Elba Sangronis*, Alexia Torres* y Neida Sanabria**

RESUMEN

Las leguminosas contienen nutrimentos, pero también están presentes factores antinutricionales que en algunos casos limitan su completo aprovechamiento. Se sabe que la germinación de las leguminosas mejora la biodisponibilidad de nutrimentos y disminuye factores antinutricionales como son los inhibidores de proteasas, entre otros. En este estudio se determinó el efecto de la germinación en el contenido de rafinosa, estaquiosa y verbascosa y de los inositol fosfatos presentes en los granos germinados de *Phaseolus vulgaris* L. y de *Vigna sinensis* v. Tuy y v. Orituco. Los granos fueron germinados en presencia de luz y se liofilizaron para posteriormente preparar harinas a las cuales se les determinó su contenido de α -galactósidos y de inositol fosfatos empleando técnicas de HPLC. Se observó que la germinación degrada los α -galactósidos y los inositol fosfatos, lo que permite sugerir la germinación como método para eliminar dichos factores antinutricionales.

Palabras Clave: Inositol fosfatos; α -galactósidos; caraotas; phaseolus; vigna.

* Profesores y ** Estudiante de postgrado. Universidad Simón Bolívar Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Sartenejas- Baruta. Estado Miranda. Venezuela. E-mail: esangron@usb.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

PHYTATES AND α -GALACTOSIDES IN GERMINATED SEEDS OF *Phaseolus vulgaris* AND *Vigna sinensis*

Elba Sangronis*, Alexia Torres* y Neida Sanabria**

SUMMARY

Legumes contain nutrients, but also there are antinutritional factors present that in some cases limit their whole utilization. It is known that the germination of legumes improves the bioavailability of nutrients and decreases antinutritional factors such as protease inhibitors, among others. In this study, the effect of germination on the contents of raffinose, stachyose and verbascose and of inositol phosphates present in germinated seeds of *Phaseolus vulgaris* L. and of *Vigna sinensis* v. Tuy and v. Orituco was determined. Grains were germinated in the presence of light and were lyophilised prior to the preparation of flours which were analyzed to determine the content of α -galactosides and inositol phosphates, using HPLC techniques. It was observed that germination degrades α -galactosides and inositol phosphates, which suggests that germination may constitute a method for the elimination of such antinutritional factors.

Key Words: Inositol phosphates; α -galactosides; black beans; phaseolus; vigna.

* Profesores y Estudiante de postgrado. Universidad Simón Bolívar Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Sartenejas- Baruta. Estado Miranda. Venezuela. E-mail: esangron@usb.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son de gran interés para la dieta humana, especialmente en aquellas zonas rurales de muchos países del mundo, incluyendo Venezuela. Dichos granos son una fuente económica de proteínas, carbohidratos, fibra, minerales y algunas vitaminas, sobre todo si se compara con otros alimentos de origen animal que aportan nutrientes, pero que son poco accesibles para los sectores de la población con menos recursos económicos (Tharanathan y Mahadevamma, 2003).

Las leguminosas contienen factores antinutricionales que limitan el aprovechamiento y/o disminuyen su consumo. Entre dichos factores están los inhibidores de tripsina, saponinas, fitatos, taninos, α -galactósidos, entre otros. Los fitatos acomplejan nutrientes, mientras que la producción de flatulencia que aqueja a algunas personas después del consumo de granos es parcialmente atribuida a la rafinosa, estaquirosa y verbascosa, es decir los α -galactósidos.

Existen otras formas no convencionales de procesar los alimentos que mejoran el valor nutritivo y disminuyen los fitatos y α -galactósidos como son la fermentación (Granito *et al.*, 2005), mientras que la germinación de caraotas negras y blancas reduce el contenido de ácido fítico (Machado y Sangronis, 2007). Sin embargo, no se sabe que pasa con los compuestos derivados del ácido fítico y con la rafinosa, estaquirosa y verbascosa. De allí que en este estudio se evaluó la influencia de la germinación del *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis* sobre el contenido de los α -galactósidos y los diversos fitatos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Los granos de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris* L. var Tacarigua) y frijol claro (*Vigna sinensis* var. Tuy y Orituco) fueron suministradas por el INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas).

Germinación: Los granos fueron lavados con agua potable, desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% y enjuagados con agua destilada para eliminar residuos. Las semillas desinfectadas se remojaron en agua en una relación 1:3 (p/p) por 5 horas y luego escurridas, secadas con papel absorbente y extendidas sobre bandejas de aluminio porosas, y germinadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 días, en presencia de luz. Para

mantener un nivel óptimo de hidratación, las semillas se humectaron diariamente con agua destilada en forma de “spray” (Machaiah, 1999).

Preparación de las harinas: Los granos germinados se liofilizaron y se molieron hasta una granulometría de 40 mesh y se obtuvieron harinas, las cuales fueron almacenadas en frascos de vidrios y refrigeradas hasta su posterior análisis. Con fines comparativos se preparó una harina de granos sin germinar.

α -galactósidos: Se determinaron rafinosa, estaquiosa y verbascosa por HPLC según la metodología descrita por Frías *et al.* (1994).

Inositol fosfatos: Se determinaron inositol hexafosfato (IP_6), inositol pentafofosfato (IP_5), inositol tetrafosfato (IP_4) inositol trifosfato (IP_3), los cuales fueron extraídos según el método descrito por Kozłowska *et al.* (1996) y cuantificados por HPLC según lo descrito por Lerhfeld (1994).

Análisis estadístico: Se calcularon la media y desviación estándar de triplicados. Se compararon las muestras germinadas y no germinadas utilizando t- student. Se utilizó el programa SPSS y el nivel de significación se estableció como $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro se presentan el contenido de los tres α -galactósidos y de los inositol fosfatos de los granos sin germinar y germinados. En relación a α -galactósidos, se observó que en los granos sin germinar de *P. vulgaris* sólo se detectó la estaquiosa, pero una vez que los granos se germinaron el único α -galactósidos detectado fue la rafinosa, y en una baja concentración.

Con respecto a la *V. sinensis* variedad Tuy sin germinar se detectó la presencia de estaquiosa, la cual se degradó por completo como efecto de la germinación. Efecto similar en la degradación de los α -galactósidos han sido estudiado por Vidal-Valverde *et al.* en 2001. Contrariamente, en los granos sin germinar de *Vigna sinensis* variedad Orituco se detectó la presencia de rafinosa y estaquiosa, los cuales se degradaron por efecto de la germinación. Durante dicho proceso ocurre una movilización de la reserva de nutrimentos, y es posible que alguno de los α -galactósidos hallan sido utilizados como fuente de energía o para sintetizar otros compuestos.

CUADRO. α -galactósidos e inositol fitatos en *Phaseolus vulgaris* L. y *Vigna sinensis*.

Muestra	Antinutrientos	NoGerminadas	Germinadas
<i>Phaseolus vulgaris</i> (v.Tacarigua)	Rafinosa	Nd	0,26±0,02
	Estaquirosa	2,53±0,05	Nd
	Verbascosa	Nd	Nd
	IP6	0,47±0,03 ^a	0,25±0,01 ^b
	IP5	Nd	0,06±0,00
	IP4	Nd	0,06±0,040
	IP3	Nd	0,09±0,01
<i>Vigna sinensis</i> (v.Tuy)	Rafinosa	Nd	Nd
	Estaquirosa	5,90±0,06	Nd
	Verbascosa	Nd	Nd
	Inositol Fosfato		
	IP6	0,36±0,02 ^a	0,20±0,01 ^b
	IP5	0,08±0,01 ^a	0,12±0,00 ^b
	IP4	0,03±0,03 ^a	0,05±0,00 ^b
IP3	0,04±0,02 ^a	0,04±0,01 ^a	
	Total	0,51±0,02 ^a	0,40±0,01 ^b
<i>Vigna sinensis</i> (v. Orituco)	Rafinosa	0,65±0,04	Nd
	Estaquirosa	6,03 ±0,08	Nd
	Verbascosa	Nd	Nd
	IP6	0,36±0,03 ^a	0,20±0,04 ^b
	IP5	0,06±0,02 ^a	0,08±0,02 ^b
	IP4	Nd	Nd
	IP3	Nd	Nd

Nd= no detectado

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05)

En relación al contenido de ácido fítico y sus derivados, se observó que en los granos sin germinar de *P. vulgaris*, la principal forma de fosfato era el ácido fítico (IP₆), mientras que en la variedad Tuy de *V. sinensis* se detectó la presencia de IP₆, IP₅, IP₄ e IP₃ pero sólo las formas IP₆ e IP₅ en la variedad Orituco.

Como un efecto de la germinación se observó una disminución del IP₆ en 47,1% en *P. vulgaris* y del 94,5% en *V. sinensis* var. Tuy y Orituco, lo que indica la degradación de ácido fítico durante el proceso germinativo. La presencia de las formas hidrolizadas de fitatos en los granos de *V. sinensis* (IP₆, IP₅, IP₄ e IP₃ para var. Tuy y de IP₅ para la var. Orituco) se traduce en una mayor disponibilidad de minerales, mayor absorción de proteínas, mejor funcionalidad y digestibilidad del alimento (Bilgiçli y Elgun, 2005). De acuerdo a lo observado se puede concluir que la germinación disminuye los α -galactósidos y los inositol fosfatos de los granos de *P. vulgaris* y de *V. sinensis* por lo que constituye una alternativa para mejorar el aprovechamiento de los nutrimentos presentes en las leguminosas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

BILGIÇLI, N. and A. ELGUN. 2005. Changes in some physical and nutritional properties of Tarhana, a Turkish fermented cereal food, added various phytase sources. *Food Sci Tech Int* 11(5):383–389.

FRÍAS, J., C. HEDLEY, K. R., PRICE, R. G. FENWICK and C. VIDAL-VALVERDE. 1994. Improved method for the analysis of alpha-galactosides in pea seeds by capillary zone electrophoresis - Comparison with high- performance liquid chromatography triple-pulsed amperometric detection. *J Liquid Chromatogr* 17:2 469-2 483.

GRANITO, M., A. TORRES, J. FRÍAS, M. GUERRA and C. VIDAL-VALVERDE. 2005. Influence of fermentation on the nutritional value of two varieties of *Vigna sinensis*. *Eur Food Res Technol* 220:176-181.

KOZLOWSKA, H., J. HONKE, J. SADOWSKA, J. FRÍAS and C. VIDAL-VALVERDE. 1996. Natural fermentation of lentils: Influence of time, concentration and temperature on the kinetics of hydrolysis of inositol phosphates. *J Sci Food Agric* 71:367-375.

LERHFELD, J. 1994. HPLC Separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: Problems and solutions. *J Agric Food Chem.* 42:2 726-2 731.

MACHADO, C. J. and E. SANGRONIS. 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *Lebens-Wiss U-Technol.* 40(1):116-12 .

MACHAIAH, J., M. PEDNEKAR and P. THOMAS. 1999. Reduction in flatulence factors in mung beans (*Vigna radiata*) using low-dose g-irradiation. *J Sci Food Agric* 79:648-652.

THARANATHAN R.N and S. MAHADEVAMMA. 2003. Grain legumes- a boon to human nutrition. *Trends Food Sci Tech* 14:507-518.

VIDAL-VALVERDE C, J. FRIAS, I. SIERRA, I. BLAZQUEZ, F. LAMBEIN and Y. KUO. 2002. New funcional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *Eur Food Res Technol* 215:472-477.

INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN LA COMPOSICIÓN DEL *Phaseolus vulgaris* Y *Vigna sinensis*

Mercedes Ramos de Vega* y Elba Sangronis*

RESUMEN

Las leguminosas son fuente de proteínas que al combinarla con cereales incrementa su valor biológico. Adicionalmente, las leguminosas son fuente de calorías, hierro, fósforo, magnesio y potasio. Las caraotas negras, *Phaseolus vulgaris*, son además una buena fuente de calcio. En este estudio se determinó el contenido de proteínas, grasas, cenizas, fibra dietética soluble e insoluble y de los minerales Cu, K, Na, Ca, Fe, Mg, P, Zn y Mn, en caraotas negras y en frijoles, *Vigna sinensis*, variedad Tuy y Orituco. Las leguminosas fueron germinadas a 25 ± 2 °C, en presencia de luz natural y humedad relativa de $78 \pm 4\%$. La composición proximal se determinó siguiendo la metodología oficial. Para la determinación de minerales se utilizó un equipo de Plasma de Acoplamiento Inducido (ICP). Con fines comparativos, se utilizaron granos sin germinar. Se observó que la germinación incrementa el contenido de proteína en aproximadamente 7% y de fibra soluble en frijoles Tuy en 2% en frijoles Orituco. También se observó una disminución del contenido de grasa de 25% en las caraotas y en un poco más de 50% en frijoles. La germinación afecta el contenido de minerales en las caraotas y en las dos variedades de frijoles, sin una tendencia definida. Se demostró que la germinación varía la composición de las caraotas negras y frijoles variedad Tuy y Orituco.

Palabras Clave: Leguminosas; germinación; minerales.

* Estudiante de doctorado y Profesora. Universidad Simón Bolívar. Departamento de de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Sartenejas. Baruta, estado Miranda. Venezuela. E-mail: esangron@usb.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INFLUENCE OF GERMINATION ON COMPOSITION OF *Phaseolus vulgaris* AND *Vigna sinensis*

Mercedes Ramos de Vega* y Elba Sangronis*

SUMMARY

Legumes are a source of proteins that combined with cereals increase its biological value. In addition, legumes calories source, iron, phosphorous, magnesium and potassium. Black beans, *Phaseolus vulgaris* are also a good source of calcium. In this study, the content of protein, fat, ash, dietetic fibre, both soluble and insoluble, and the minerals Cu, K, Na, Ca, Fe, Mg, P, Zn and Mn, were determined in *Phaseolus vulgaris* and *Vigna sinensis*, Tuy and Orituco varieties. Legumes were germinated at 25 ± 2 °C, in natural light and $78 \pm 4\%$ relative humidity. Proximal composition was determined according to official methods. An Induced Coupling of Plasma (ICP) equipment was used for the determination of the minerals. For comparison purposes, non-germinated grains were used. It was observed that germination increases the content of proteins in about 7% in both legumes and 2% of soluble fibre in *Vigna sinensis* var. Tuy. Fat content also decreased 25% in black beans and more than 50% in *Vigna sinensis*. Germination affects the mineral content of both legumes, without a definite trend. It was demonstrated that germination varies the composition of both legumes.

Key Words: legumes, germination, minerals.

* Estudiante de doctorado y Profesora. Universidad Simón Bolívar. Departamento de de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Sartenejas. Baruta, estado Miranda. Venezuela. E-mail: esangron@usb.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son una vasta familia de plantas utilizadas en alimentación por ser una excelente fuente de nutrimentos, en especial de proteínas y calorías. En dietas vegetarianas o pobres en proteína de origen animal, las leguminosas son el complemento adecuado de los cereales, por lo que se encuentra esta combinación en numerosas comidas tradicionales (Champ, 2001).

En general, las leguminosas también son fuente de hierro, fósforo, magnesio y potasio y contienen además calcio, sodio, zinc, manganeso y cobre. Las leguminosas más consumidas en el país son las caraotas negras, *Phaseolus vulgaris*, y el frijol, *Vigna sinensis*. No obstante, su producción ha venido disminuyendo gradualmente en los últimos años (MAC, 1999). En estudios con soya y otras leguminosas se han evidenciado los cambios en su composición como efecto de los procesamientos a los cuales son sometidos.

La germinación, un proceso poco convencional, al movilizar los nutrimentos de reserva, incrementa la digestibilidad proteica (Schulze y *et al.*, 1997) y remueve o disminuye algunos factores antinutricionales (Muzquiz *et al.*, 1998); por lo que representa una alternativa para mejorar el aprovechamiento de los nutrimentos presentes en las leguminosas.

En el presente estudio se determinó el efecto de la germinación en la composición proximal y en el contenido de minerales de las caraotas negras (v. Tacarigua) y de dos variedades de frijol (v. Tuy y v. Orituco).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Los granos de caraotas negras (var Tacarigua) y frijol claro (var. Tuy y Orituco) fueron suministradas por el INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas).

Germinación: Los granos secos se desinfectaron en una solución de hipoclorito al 0,2%, enjuagándose con agua destilada, hasta remojarlos durante 10 h en agua destilada en proporción 3:1 (peso/peso). Luego se escurrieron y extendieron en bandejas sobre papel absorbente, para germinar a temperatura ambiente en presencia de luz, hasta que la radícula del germinado alcanzó aproximadamente 4 cm de longitud, lo cual ocurrió

a los 5 días. Durante la germinación los granos se rociaron con agua para mantenerlos húmedos. Los granos germinados se liofilizaron y molieron para preparar las harinas, las cuales se conservaron en refrigeración hasta su posterior análisis. Con fines comparativos, se preparó la harina de granos sin germinar.

Análisis

Proteína: El contenido de nitrógeno fue determinado según el método 960.052, AOAC (1990). Para transformar el nitrógeno en proteína se utilizó 6,25 como factor de conversión.

Grasa: Se siguió el método 920,30, AOAC (1990).

Ceniza: Se siguió el método 923,03, AOAC (1990).

Fibra Dietética Soluble (FDS) e Insoluble (FDI): Según el método de Prosky *et al.* (1992).

Minerales: Se determinaron los siguientes minerales: Cu, K, Na, Ca, Fe, Mg, P, Zn y Mn, por el método de plasma inducido, utilizando un equipo de Plasma de Acoplamiento Inducido (ICP) de acuerdo al método 984,27 AOAC (1990).

Análisis estadístico: Se calcularon la media y desviación estándar de triplicados. Se compararon las muestras germinadas y no germinadas utilizando t- student. Se utilizó el programa SPSS y el nivel de significación se estableció como $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observan los cambios en el contenido de proteína, grasa, ceniza y fibra soluble e insoluble por efecto de la germinación. Se evidencia un incremento significativo ($P < 0,05$) de aproximadamente un 7% en el contenido de proteína de las 3 leguminosas estudiadas. Con respecto a la fibra, la germinación disminuyó la fibra insoluble, pero en el caso de la soluble la incrementó en el frijol variedad Tuy. Se observó que el contenido de grasa disminuyó en un 25% en las caraotas y en un poco más de 50% en frijoles.

CUADRO 1. Proteínas, grasas, cenizas y fibra dietética insoluble (FDI) y soluble (FDS) en semillas germinadas y sin germinar de caraotas negras, *Phaseolus vulgaris* y frijoles, *Vigna sinensis*.

Muestras	Proteína g 100 g ⁻¹	Grasa g 100 g ⁻¹	Cenizas g 100 g ⁻¹	FDI g 100 g ⁻¹	FDS g 100 g ⁻¹
Caraota sin germinar	22,9±0,5 ^a	1,2±0,1 ^a	3,9±0,1 ^a	21,5±0,1 ^a	3,3±0,1 ^a
Caraota germinada	24,3±0,1 ^b	0,9±0,1 ^b	3,7±0,1 ^b	19,2±0,2 ^b	3,0±0,2 ^b
Frijol Tuy sin germinar	25,8±0,1 ^a	2,2±0,1 ^a	3,8±0,3 ^a	18,8±0,7 ^a	2,2±0,1 ^a
Frijol Tuy germinado	27,5±0,1 ^b	1,0±0,1 ^b	3,4±0,5 ^b	17,3±0,5 ^b	2,4±0,1 ^b
Frijol Orituco sin germinar	25,9±0,1 ^a	2,3±0,1 ^a	3,8±0,2 ^a	19,5±0,4 ^a	2,4±0,4 ^a
Frijol Orituco germinado	27,4±0,1 ^b	1,1±0,1 ^b	3,5±0,1 ^b	18,1±0,7 ^b	2,3±0,1 ^b

FDI: fibra dietética insoluble. FDS: Fibra dietética soluble. Letras iguales en las muestras de la misma leguminosa indican no diferencias significativas (P<0,05).

En el Cuadro 2 se observa el contenido de minerales en las tres leguminosas no germinadas y germinadas. No se observó una homogeneidad en el efecto de la germinación en el contenido de minerales, lo cual concuerda con lo señalado por Sangronis y Machado (2007).

El Mg es el único mineral que aumenta en las tres leguminosas germinadas. Estos resultados en cierto modo coinciden con lo presentado por Donangelo *et al.* (1995) quienes observaron un descenso en el contenido de Fe en caraotas negras germinadas por 48 horas en oscuridad, atribuido posiblemente al remojo de los granos previo a la germinación.

Se puede concluir que la germinación como proceso metabólico que provoca cambios en la composición de la semilla que necesitan ser determinados antes de considerar la germinación como proceso alternativo para eliminar o disminuir factores antinutricionales en las semillas de leguminosas.

CUADRO 2. Contenido de Fe, Zn, Mn, Cu, K, Na, Ca, Mg y P (mg 100 g⁻¹) en semillas en semillas germinadas y sin germinar de caraotas negras, *Phaseolus vulgaris* y frijoles, *Vigna sinensis*.

	Caraota sin germinar	Caraota germinada	Frijol Tuy sin germinar	Frijol Tuy germinado	Frijol Ortuto sin germinar	Frijol germinado
Fe	7,58 ± 1,44 ^a	5,79 ± 0,06 ^b	8,80 ± 0,44 ^a	6,40 ± 0,52 ^b	9,80 ± 0,08 ^a	2,51 ± 0,17 ^b
Zn	2,36 ± 0,05 ^a	3,06 ± 0,02 ^b	5,50 ± 0,02 ^a	6,32 ± 0,10 ^b	6,70 ± 0,04 ^a	4,20 ± 0,02 ^b
Mn	1,47 ± 0,04 ^a	1,64 ± 0,01 ^a	1 105 ± 1 ^a	1 332 ± 1 ^b	938 ± 1 ^a	1 038 ± 5 ^b
Cu	1,91 ± 0,07 ^a	2,21 ± 0,19 ^a	1 008,9 ± 0,1 ^a	1 138,4 ± 8,3 ^b	1 132,8 ± 2,5 ^a	936,9 ± 1 ^b
K	1 814 ± 19 ^a	2 152 ± 10 ^b	1 563 ± 1 ^a	1 702 ± 1 ^b	1 099 ± 1 ^a	835 ± 1 ^b
Na	73 ± 1 ^a	47 ± 8 ^b	57 ± 1 ^a	79 ± 1 ^b	115 ± 1 ^a	77 ± 12 ^b
Ca	41,2 ± 0,1 ^a	50,9 ± 0,5 ^b	157,8 ± 0,8 ^a	78,5 ± 0,2 ^b	136 ± 2 ^a	91,2 ± 3,5 ^b
Mg	1 56,6 ± 1,2 ^a	205,4 ± 0,8 ^b	178,8 ± 0,2 ^a	190,1 ± 0,1 ^b	177,3 ± 0,9 ^a	154,2 ± 2,2 ^b
P	503,2 ± 2,0 ^a	627,2 ± 3,2 ^b	437 ± 18 ^a	602,4 ± 0,8 ^b	536 ± 23 ^a	488,2 ± 0,3 ^b

Letras iguales en las muestras de la misma leguminosa indican no diferencias significativas (P<0,05).

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. U.S.A.

CHAMP, M. 2001. 4th European Conference on grain legumes. Cracow, pp. 109-113.

DONANGELO, C. M., L. C. TRUGO, N. M. TRUGO and B. O. EGGUM. 1995. Food Chem. 53:23-27.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC). 1999. Anuario Estadístico Agropecuario 1992-1999. Ministerio de Agricultura y Cría. Dirección de Estadística. Caracas, Venezuela.

MUZQUIZ, M., M. M PEDROSA, C. CUADRADO, G. AYET, C. BURBANO and A. BRENES. 1998. **In:** Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed. Hill, A. J., Huisman, G. D. y van der Poel, J. (Eds.). EAAP Publication N° 93, Wageningen Pers., pp. 387-390.

PROSKY, L., N. ASP, G. SCHWEIZER, T. F. DEVRIES, J. W. and I. FURDA. 1992. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75: 360-367.

SANGRONIS, E. and C. MACHADO. 2007. Lebens-Wiss U-Technol. 40(1):116-120

SCHULZE, H., F. H. SAVELKOUL, M. W. VERSTEGEN, A. F. VAN DER POEL, S. TAMMINGA and N. S. GROOT. 1997. J. Anim. Sci. 75: 3187-3194.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA GALLETA EXTENDIDA CON CARAOTAS BLANCAS

Marisela Granito*, Yolmar Valero*,
Rosaura Zambrano* y Marisa Guerra*

RESUMEN

La ingesta energética-proteica de los niños en edad escolar determina no sólo su rendimiento, sino su futuro desarrollo como individuos. En Venezuela, no existen deficiencias de proteínas en este grupo etario, sin embargo, es importante sustituir el consumo frecuente de alimentos que sólo aportan carbohidratos, por el de alimentos que les aporten nutrimentos, como las proteínas. En este trabajo se desarrollaron galletas dulces sustituyendo la harina de trigo en un 25%, 30% y 35% por harinas de caraotas blancas, *Phaseolus vulgaris*, sin fermentar y fermentadas con la flora endógena de los granos a 42 °C por 48 h. Se midió aceptabilidad global y la aceptabilidad de los atributos sensoriales apariencia, sabor, textura y color, a nivel de laboratorio utilizando 15 panelistas semi-entrenados y una escala hedónica no estructurada de 7 puntos. Se encontró que las galletas más aceptadas resultaron ser las extendidas con 30% de harina de caraota fermentada y 30% de harina de caraota sin fermentar, por lo que estas galletas fueron sometidas a una prueba de aceptabilidad con consumidores (60 escolares). No se encontraron diferencias significativas en la aceptabilidad entre las galletas extendidas con harinas fermentadas y sin fermentar. Se concluyó que es posible extender la harina de trigo con harina de caraota blanca fermentada y sin fermentar, obteniéndose una galleta dulce que puede ser utilizada como alimento complementario energético-proteico para la merienda escolar.

Palabras Clave: Galletas; caraota; *Phaseolus vulgaris*; trigo; aceptabilidad; composición química.

* Profesores. Universidad Simón Bolívar. Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Apdo. 1090A, Caracas. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A COOKIE EXTENDED WITH WHITE BEANS

Marisela Granito*, Yolmar Valero*,
Rosaura Zambrano* y Marisa Guerra*

SUMMARY

The protein-energetic intake of school-age children determines not only their performance but also their future development as individuals. In Venezuela, there are no protein deficiencies in this age group; however, it is important to substitute the consumption of foodstuffs that supply only carbohydrates, so common at that age, for food that supplies nutrients such as proteins. In this work, cookies were developed substituting wheat flour in 25%, 30% and 35% for white bean flour, unfermented and fermented with the bean endogenous flora at 42 °C for 48 h. Overall acceptability and the acceptability of the sensorial attributes: appearance, taste, texture and color were measured at laboratory level using semi-trained panelists and a non-structured hedonic scale of 7 points. It was found that the most accepted cookies were the ones extended with 30% fermented and unfermented white bean flour, which were subjected to an acceptability test with consumers (60 school children). No significant differences were found in the acceptability of the cookies extended with fermented and unfermented flours. It was concluded that it is possible to extend wheat flour with fermented and unfermented white bean flours, obtaining a cookie that can be used as a complementary protein-energetic food for the school snack.

Key Words: Cookies, Bean, wheat, acceptability, chemical composition

* Profesores. Universidad Simón Bolívar. Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Apdo. 1090A Caracas. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

La caraota *Phaseolus vulgaris*; es la leguminosa más consumida en diversos países de Latinoamérica y de África (Maza, 1998). En Venezuela, forma parte de los hábitos alimenticios de la población y representa una buena fuente de proteínas, carbohidratos, fibra, minerales y vitaminas (Mora, 1997).

Los componentes antinutricionales naturalmente presentes en las caraotas, tales como inhibidores de proteasas y fitatos y polifenoles, así como los compuestos productores de flatulencia, α -galactosidos, rafinosa, estaquiosa, verbascosa y la fibra soluble, afectan la digestibilidad de los nutrimentos y producen malestar intestinal (Granito *et al.*, 2001). Bioprocesos como la fermentación natural de las caraotas y su posterior cocción, disminuyen significativamente los factores productores de flatulencia, mejorando además la calidad nutricional de los granos (Granito *et al.*, 2002; 2003) e incrementando su valor como ingrediente funcional (Granito *et al.*, 2004).

La ingesta energético-proteica de poblaciones vulnerables, como niños y ancianos, determina su desarrollo y calidad de vida. En Venezuela se han implementado programas de alimentación que incluyen alimentos ricos en proteínas y que disminuyen el consumo de carbohidratos simples y grasa saturada (INN, 2000).

Los productos horneados a base de trigo, como las galletas, constituyen un excelente vehículo de nutrimentos, considerando su alto consumo y aceptabilidad. Dado que el trigo se importa en un 100% y que la calidad de su proteína es baja por las deficiencias en lisina, la preparación de mezclas de trigo con leguminosas como las caraotas blancas bioprocesadas, podría ser una alternativa para incrementar la calidad proteica de la harina compuesta.

La complementación aminoacídica que se produce al combinar cereales con leguminosas es equivalente a la que se obtiene al ingerir productos de origen animal (Bressani *et al.*, 2002). Considerando los antecedentes antes expuestos, en este trabajo se planteó como objetivo caracterizar química y sensorialmente galletas de trigo extendidas con caraotas blancas bioprocesadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los granos de caraota blanca variedad Victoria utilizados para la elaboración de las galletas fueron suministrados por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (INIA, Maracay). Los ingredientes restantes fueron adquiridos en el mercado local.

Obtención de harinas: Las harinas sin fermentar (CSF) se obtuvieron a partir de granos de caraotas previamente cocidos y secados en estufa con circulación de aire a 40 °C y molidos hasta un tamaño de partícula de 40Mesh.

Para la obtención de las harinas de caraotas blancas fermentadas (CF), se partió de granos de caraota blanca higienizados por 5 min con una solución estéril de ácido cítrico al 5%, los cuales se fermentaron en agua estéril en una proporción 1:4 (p/v), durante 48 horas a 42 °C y 440 rpm en un micro fermentador marca New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison New Cork, U.S.A. modelo BIOFLO 2000. Los granos fermentados fueron escurridos y liofilizados, molidos y tamizados, obteniéndose una harina con granulometría de 40Mesh.

Elaboración de productos: Para la preparación de las galletas, la harina de trigo fue extendida en un 25%, 30% y 35% con las harinas de caraotas blancas cocidas y bioprocesadas, e incorporadas a la mezcla de azúcar, huevo, mantequilla y saborizantes. Las mezclas fueron amasadas, laminadas y cortadas en círculos de 4 cm de diámetro, 0,5 cm de espesor y 10 g de peso aproximadamente. Seguidamente se hornearon a 250 °C por 15 min, se dejaron enfriar y se almacenaron en bolsas de polietileno, hasta la realización de los análisis sensoriales y químicos.

Evaluación sensorial: Para determinar el porcentaje óptimo de sustitución de harina de trigo por harina de CF y CSF, 15 panelistas semi-entrenados evaluaron por triplicado, a través de una escala hedónica no estructurada de 7 puntos (1 = me disgusta mucho, 7 = me gusta mucho), los atributos apariencia, sabor, textura, color y aceptabilidad global de galletas sustituidas al 25%, 30% y 35% con harina de CF y CSF, las cuales fueron codificadas aleatoriamente.

Las galletas seleccionadas sensorialmente a nivel de laboratorio fueron evaluadas por 60 potenciales consumidores de edades comprendidas entre 8 y 12 años. Estos panelistas no entrenados realizaron una prueba de

preferencia entre la galleta extendida con harina de CF y la extendida con harina de CSF debiendo indicar cual era su preferida, teniendo asimismo la posibilidad de indicar que las dos le gustaban por igual.

Caracterización química de las galletas: Las galletas seleccionadas fueron caracterizadas en cuanto a humedad, proteína (N \times 6, 25), grasa y cenizas totales de acuerdo a la metodología AOAC (1990). Así mismo, se cuantificaron los minerales utilizando Espectroscopia de Emisión Atómica con un equipo Ar Spectroflame D (Ar ICP) a partir del residuo de cenizas disuelto en ácido, de acuerdo al método 984,27 (AOAC, 1990). El aporte nutricional fue calculado considerando que las proteínas y carbohidratos aportan 4 Cal/g y las grasa 9 Cal/g.

Análisis estadísticos: Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de tres determinaciones y sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con posterior comparación de medias (test de Duncan) usando el programa Excel de Windows XP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se pueden observar los resultados obtenidos al evaluar sensorialmente las galletas sustituidas al 25%, 30% y 35% con harinas de CF y CSF. No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los parámetros medidos entre las galletas elaboradas con harina de CF y CSF, para un mismo porcentaje de sustitución, sin embargo, se puede ver que los mayores valores se obtuvieron para las galletas sustituidas al 30%.

A pesar de que el bioproceso aplicado a los granos de caraota genera acidez y compuestos volátiles, el uso de la harina de CF parece no haber afectado ni el sabor, ni el olor de las galletas elaboradas. De igual manera, la aceptabilidad total no varió de forma significativa ($P < 0,05$) entre los tres porcentajes de sustitución, sin embargo, se encontraron valores inferiores para las galletas con 35% de sustitución.

Al no encontrarse diferencias significativas entre las respuestas de los panelistas semientrenados, se decidió seleccionar aquellas galletas que, teniendo el mayor porcentaje de sustitución, hubiesen presentado la mayor aceptabilidad global y por atributo. En virtud de ello se seleccionaron las galletas con 30% de sustitución tanto de CF como CSF.

Los resultados correspondientes a la aceptabilidad de los potenciales consumidores se presentan en la Figura. Como se observa, el 45% de los niños manifestaron preferir las 2 galletas, lo cual corrobora el hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre las galletas, al hacer las pruebas sensoriales a nivel de laboratorio.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la caracterización química de una de las galletas seleccionadas. El contenido de proteínas, grasas y carbohidratos cuantificado en las galletas, se corresponden con las proporciones sugeridas por la Tabla de Requerimientos de Energía y Nutrientes para la Población Venezolana (INN, 2000). Adicional a ello, es importante destacar que la proporción de harina de trigo y harina de caraota utilizada en la mezcla para hacer las galletas seleccionadas, se corresponde con los niveles (70%-30%) sugeridos por Bressani *et al.* (2002) para lograr una complementación aminoacídica ideal en mezclas de cereales y leguminosas.

CUADRO 1. Evaluación sensorial de galletas extendidas con harina de caraota blanca fermentada y sin fermentar.

Parámetros evaluados	% Harina Caraota Blanca					
	CF			CSF		
	25	30	35	25	30	35
Apariencia	5,38 ^a	6,50 ^a	6,13 ^a	5,88 ^a	6,38 ^a	5,75 ^a
Sabor	5,88 ^a	6,50 ^a	5,88 ^a	5,62 ^a	6,00 ^a	5,88 ^a
Textura	6,00 ^{a,b}	6,25 ^a	5,13 ^b	4,63 ^a	4,88 ^a	5,50 ^a
Color	5,75 ^a	6,63 ^a	6,25 ^a	6,13 ^a	6,50 ^a	5,75 ^a
Aceptabilidad global	3,83 ^a	3,82 ^a	4,03 ^a	4,70 ^a	4,42 ^a	3,57 ^a

CF: caraota fermentada, CSF: caraota sin fermentar. Letras diferentes en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa para un mismo tratamiento, con $P > 0,05$.

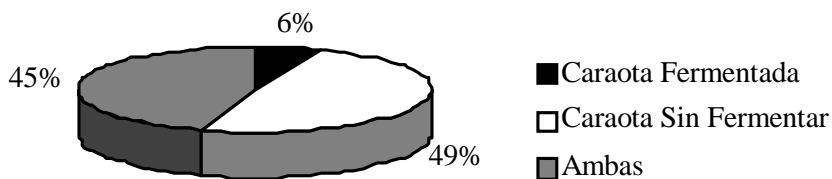


FIGURA. Aceptabilidad global en consumidores de galletas extendidas con harina de caraota fermentada y sin fermentar.

CUADRO 2. Composición proximal y aporte nutricional de galletas extendida con 30% harina de caraota blanca sin fermentar.

	Aporte Nutricional		
	Por ración (100g)	Aporte por galleta (10g)	Por ración (40g)
Humedad	1,45 ± 0,42	0,15	0,58
Proteínas*	10,29 ± 0,19	1,03 (4,12 Kcal)	4,12 (16,46 Kcal)
Grasa*	32,77 ± 8,05	3,28 (29,49 Kcal)	13,11 (117,97 Kcal)
Carbohidratos***	55,86	5,57 (22,34 Kcal)	22,34 (89,38 Kcal)
Calorías	–	55,95	223,81
Cenizas*	1,09 ± 0,18	0,109	0,436
Fe**	1,55 ± 0,91	0,155	0,620
Na**	154,96 ± 52,94	15,496	61,984
Ca**	21,47 ± 9,76	2,147	8,588
Mg**	16,77 ± 9,04	1,677	6,708
P**	59,13 ± 21,00	5,913	23,652
K**	0,01 ± 0,0001	0,001	0,004

Todos los resultados se presentan en base seca. * g; ** mg; *** calculados por diferencia

CONCLUSIÓN

- Es posible extender la harina de trigo con harina de CF y CSF, obteniéndose una galleta dulce que puede ser utilizada como alimento complementario energético-proteico para la merienda escolar.

BIBLIOGRAFÍA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1990. 15th edn. AOAC, Washington, DC, pp. 152-169.

BRESSANI R. 2002. Factors influencing nutritive value in food grain legumes: Mucuna compared to other grain legumes. **In:** Food and feed from Mucuna: Current user and the way forward. Proceedings of an International Workshop 2002. Honduras, pp.164-188.

GRANITO M., M. GUERRA, A. TORRES and J. GUINAND. 2004. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna Sinensis*. *Interciencia* 29(9):521-527.

GRANITO M., M. CHAMP, M. GUERRA and J. FRÍAS J. 2003. Effect of natural and controlled fermentation on flatus-producing compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Sci Food Agric*. 83:1 004-1 009.

GRANITO, M., J. FRÍAS, R. DOBLADO, M. GUERRA, M. CHAMP and C. VIDAL-VALVERDE. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Euro Food Resch Tech*; 214:226-231.

GRANITO, M., M.CHAMP, A. DAVID, C. BONNET and M. GUERRA. 2001. Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by *in vitro* fermentation. *J Sci Food Agric*; 81:543-550.

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN (INN). Valores de Referencia de Energía y Nutrientes para la Población Venezolana. Publ 53 Serie de Cuadernos Azules, Caracas, Venezuela.

MAZZA, G. 1998. Alimentos funcionales. Publishing CO, inc. USA. pp. 308-311.

MORA, A. 1997. Origen e importancia del cultivo de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) *Rev. Fac. Agron*. 23:225-234.

Especialidad Biotecnología Vegetal

AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE HUELLAS MOLECULARES EN GENOTIPOS DE ARROZ MEDIANTE ISOENZIMAS CON FINES DE PROPIEDAD INTELECTUAL

María Cecilia Perdomo Leiva*, Erika Arnao*, Catalina Ramis**,
Yreny de Faria** e Iris Pérez-Almeida***

RESUMEN

La caracterización de variedades se realiza generalmente mediante descriptores morfológicos, los cuales presentan limitaciones como alta influencia ambiental y poca capacidad de distinguir genotipos élitos emparentados. Como alternativa se ha propuesto la caracterización bioquímica basada en el polimorfismo isoenzimático para la caracterización y descripción de cultivares de arroz, como una estrategia complementaria y de bajo costo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de las isoenzimas en la obtención de huellas moleculares de variedades de arroz venezolanas. Para ello se evaluaron coleoptilos de 5 días de edad provenientes de 10 genotipos de arroz, con los sistemas isoenzimático: EST, ACP y SDH, separados electroforéticamente en geles discontinuos de poliacrilamida. A partir de los zimogramas obtenidos para las tres isoenzimas, se construyó una matriz de presencia/ausencia de bandas con la cual se realizó un análisis de agrupamiento (UPGMA) basado en la distancia de Jaccard. El dendrograma obtenido permitió distinguir solamente cinco genotipos, lo que evidencia la necesidad de utilizar un mayor número de isoenzimas para obtener la huella molecular de variedades de arroz venezolanas.

Palabras Clave: Isoenzimas; marcadores moleculares; *Oryza sativa* L.

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC.
E-mail: marac.perdomo@danac.org.ve - erika.arnao@danac.org.ve

** Profesora Agregado y Asistente de Investigación, respectivamente. UCV. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

*** Investigadora. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP).
E-mail: iperez@inia.gob.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ADVANCES ON ISOENZYME MOLECULAR FINGERPRINTING OF RICE GENOTYPES WITH INTELLECTUAL PROPERTY RIGHT PURPOSES

María Cecilia Perdomo Leiva*, Erika Arnao*, Catalina Ramis**, Yreny de Faria** e Iris Pérez-Almeida****

SUMMARY

Variety characterization is usually performed using morphological descriptors. These descriptors are highly influenced by environmental conditions, and they poorly distinguish among closely related lines. As an alternative, biochemical characterization using isozymes polymorphism is a relative low-cost method better suited to characterize rice germplasm, particularly closely related rice lines. The objective of this research was to evaluate isozymes as molecular markers suited for fingerprinting of Venezuelan rice varieties. A set of ten rice varieties was screened. From each, five day-old coleoptiles were collected. The isozyme systems used were EST, ACP y SDH, on discontinued acrylamide gels. From the resulting zymograms, a present/absent matrix was constructed. Grouping analysis was obtained using the UPGMA method, calculated from Jaccard coefficients. The dendrogram obtained only distinguished five of the varieties, indicating that more isozyme systems are required for molecular fingerprinting of Venezuelan rice varieties.

Key Words: Isozymes; molecular markers; *Oryza sativa* L.

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC.
E-mail: marac.perdomo@danac.org.ve - erika.arnao@danac.org.ve

** Profesora Agregado y Asistente de Investigación, respectivamente. UCV. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

*** Investigadora. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP).
E-mail: iperez@inia.gob.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Dado el hecho que el mejorador debe aplicar una serie de procedimiento para la obtención de una nueva variedad, que involucra entre otros aspectos, el conocimiento científico, tiempo, esfuerzo e inversiones financieras, en los últimos años se ha implementado a nivel mundial, sistemas de protección de las variedades obtenidas en programa de mejoramiento (Guevara, 2005). Esto ha surgido como un incentivo a la capacidad creadora del mejorador, mediante el reconocimiento a la inversión financiera, que estimulen futuras creaciones.

Para obtener la protección de las variedades vegetales, se debe cumplir con los requisitos de: distinción, uniformidad y estabilidad. En Venezuela, la verificación de los requisitos se realiza a través del Servicio Nacional de Semilla (SENASA), utilizando descriptores morfológicos. Estos descriptores, pese a que juegan un papel muy importante en la divulgación de las características morfológicas, poseen algunas limitaciones como alta influencia ambiental y poca capacidad de distinguir cultivares emparentados (Díaz, 2005).

Las variedades de arroz a ser registrada comúnmente satisfacen los estándares de homogeneidad y estabilidad, no sucede igual con la distinción, debido a la estrecha base genética de las variedades (Cueva-Pérez *et al.*, 1992). En tal sentido, se ha propuesto la utilización de marcadores moleculares para la descripción y caracterización de cultivares de arroz, entre ellos, se encuentran los marcadores bioquímicos, basado en el polimorfismo isoenzimático, y los marcadores basados en ADN (Medida *et al.*, 2006). Estas metodologías son herramientas complementarias y de bajo costo para cumplir con el requisito de distinguibilidad. Rodríguez (2001) y Ortiz *et al.* (2002) señalan que estas herramientas son útiles también para la verificación de la pureza varietal en Venezuela. Por esta razón, se propuso realizar una evaluación preliminar de la capacidad de las isoenzimas para la obtención de huellas moleculares de variedades de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se efectuó en el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central

de Venezuela. Como material vegetal se utilizó 10 genotipos de arroz, como tejido vegetal se seleccionó coleóptilos de arroz de 5 y 15 días después de la emergencia de plántulas sembradas en cámara húmeda.

Las muestras se homogeneizaron en un mortero, con la adición de un tampón de extracción llamado Glutation, a una relación de 1:2 (tejido:tampón). Las enzimas evaluadas fueron las esterasas (EST: E.C.3.1.1.1), fosfata ácida (ACP: E.C.3.1.3.2) y shikimato deshidrogenasa (SDH: E.C.1.1.1.25).

La separación electroforética se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida de 6-10% para las enzimas EST y ACP, y de 6-8% para la SDH. Como buffer de corrida se utilizó tris-glicina 1X. La corrida electroforética se realizó a 4 °C y constó de una precorrida a 70 voltios durante 15 min y una corrida a 100 voltios durante 2h aproximadamente. Para el revelado fue empleada la metodología de Vallejos (1983) con algunas modificaciones del Laboratorio de Genética Molecular CIBA.

A partir de los zimogramas obtenidos para las tres isoenzimas, se construyó una matriz binaria con base a la presencia (1) y ausencia (0) de bandas, a partir del cual se estimó el coeficiente de similitud Jaccard, utilizado para originar el dendrograma mediante el análisis de agrupamiento (UPGMA) con la asistencia de software NTSYS (versión 2,1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El dendrograma obtenido permitió observar la alta similitud entre los materiales y la escasa variabilidad de la base genética de las variedades arroz evaluadas para los tres sistemas isoenzimáticos (Figura). Estos resultados confirman la reducción de la base genética de los cultivares de arroz que se ha observado en los últimos años, debido principalmente al número reducido de progenitores empleados en la mayoría de los programas de mejoramiento genético de América Latina. Muestra de ello, es que durante el período 1971-1989, las líneas de arroz liberadas en América Latina y en el Caribe tienen en su genealogía 14 cultivares comunes, provenientes de siete países (Cuevas-Pérez *et al.*, 1992).

En cuanto a la distinguibilidad de los materiales, sólo en 5 genotipos se logró una combinación de bandas que permite diferenciarlos de los demás; por lo que es necesario evaluar un mayor número de sistemas isoenzimáticos para lograr la distinguibilidad de todas las variedades.

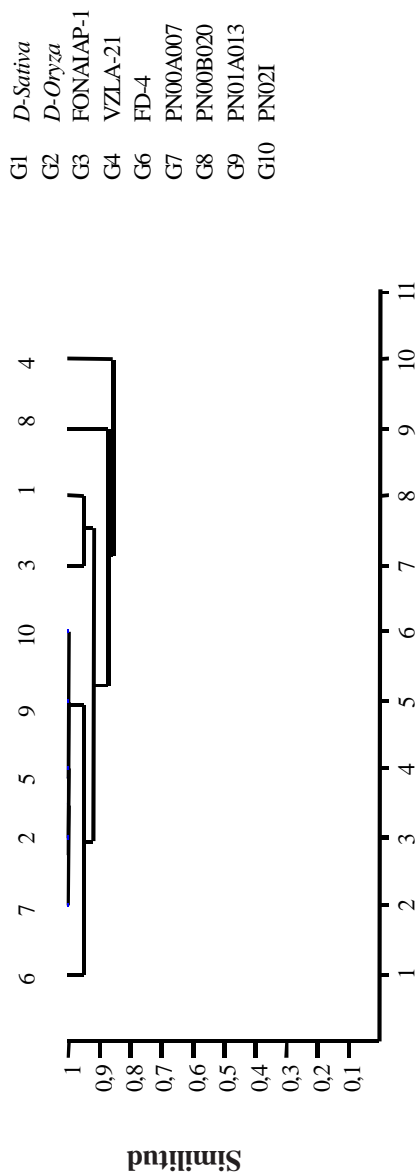


FIGURA. Dendrograma obtenido por el método UPGMA basado en la distancia de Jaccard.

CONCLUSIÓN

-Estos resultados evidencian la necesidad de utilizar un mayor número de isoenzimas y/o complementar con otro tipo de marcadores de ADN para lograr una mayor diferenciación de las variedades.

BIBLIOGRAFÍA

DÍAZ, A. 2005. Marcadores Moleculares: Estadística Básica. Instituto de Genética. FAGRO-UCV.

CUEVAS-PÉREZ, F., E. GUIMARAEZ, L. BERRIO and D. GONZÁLES. 1992. Genetic base of irrigated-rice in Latin America and the Caribbean, 1971-1989. *Crop. Sci.* 32: 1054-1059.

GUEVARA, A. 2005. Propiedad intelectual de variedades mejoradas: Patentes, UPOV, o un Sistema sui generis. [En línea] http://archive.idrc.ca/library/document/101488/chap3_s.html#USO%20ALA%20%20BIODIVERSIDAD

MEDINA, R., M. FALOCI, M. MARASSI y MROGINSKI. 2006. Identificación de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas en Argentina mediante marcadores bioquímico: su utilidad potencial para el registro de cultivares. [En línea] http://www.ipgri.cgiar.org/pgnewsletter/article.asp?id_article=1&id_issue=143

ORTIZ, A., C. RAMIS, P. PARRA, A. DÍAZ y L. LÓPEZ. 2002. Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos de Venezuela. *Revista Facultad Agronomía.* 28:117-130.

RODRÍGUEZ, N. 2001. Evaluación de la erosión de la semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) en el sistema de producción de semillas certificadas en Portuguesa. Tesis de maestría. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 55 p.

VALLEJOS, E. 1983. Enzyme activity staining. **In:** Isozyme and plant genetics and breeding, Ed. S. D. Tanksley y T. J. Orton Elsevi, Amsterdam. Parte A, 469-516.

APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA COMPARATIVA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN *Phaseolus vulgaris* ASOCIADAS A RESISTENCIA A PLAGAS

Carolina Bernal* Ivan Galindo*, Delis Pérez** y Nardy Diez*

RESUMEN

Los coleópteros de la familia bruchidae representa uno de los más importantes riesgos que enfrentan los agricultores de caraota, *Phaseolus vulgaris*, la infección por esta plaga disminuye el rendimiento de los cultivos y la calidad del grano afectando así la producción y costos de este rubro alimentario que forma parte importante de la dieta tradicional de muchos países. Varios autores han descrito un posible efecto insecticida asociado a la presencia de proteínas de almacenamiento de la familia de las lectinas (Phytohemagglutinins, PHA; Arcelin, Arc; and α -amylase inhibitor, α AI), pudiendo ser la presencia de estas una forma muy efectiva para colaborar con el control de plagas que atacan a muchas variedades de *P. vulgaris* durante su almacenaje. Algunos investigadores han centrado su atención en el análisis de estas proteínas, abordándolas de forma individual, sin tener en cuenta las posibles interrelaciones funcionales que pueden existir entre ellas. El presente trabajo utiliza la proteómica para analizar la presencia de proteínas en diferentes variedades cultivables de *P. vulgaris*, y con el uso de las electroforesis bidimensionales junto a la inmunodetección de proteínas insecticidas específicas se plantea una estrategia interesante para simplificar un proceso inicial de correlación entre la expresión de ciertas lectinas y los fenotipos observados con resistencia a los bruquidios.

Palabras Clave: *Phaseolus vulgaris*; proteómica; lectinas; arcelinas; resistencia a plagas; caraota.

1 Trabajo financiado parcialmente por el Subproyecto FONACIT-BID II N° 2004000410.

* Instituto Fundación de Estudios Avanzados (IDEA). Centro de Biotecnología, Lab. de Genómica y Proteómica. Carretera Hoyo de la Puerta, Sector Monte Elena, Baruta, Caracas 1080.

** Investigadora. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Zona Universitaria, Av. Universidad, vía El Limón. Apdo. 4653. Maracay 2101, estado Aragua Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

APPLICATION OF COMPARATIVE PROTEOMICS TO IDENTIFY PROTEINS IN *Phaseolus vulgaris* ASSOCIATED WITH PEST RESISTANCE

Carolina Bernal* Ivan Galindo*, Delis Perez** y Nardy Diez*

SUMMARY

The attack of coleopteran from the bruchidae family represent one of the most important risks that farmers confront, lowering crop yield and bean quality of *Phaseolus vulgaris*, and affecting the production costs of this important food staple in many traditional diets. Several authors describe the presence of storage proteins from the lectins family (Phytohemagglutinins, PHA; Arcelin, Arc; and α -amylase inhibitor, α AI) as insecticidal proteins, representing a very effective means to control pest attacks during storage on many varieties of *P. vulgaris*. However, these investigations focus their analysis on one protein at a time, without taking into account their functional interrelationships. The present work is aided by proteomics to analyze insecticidal protein expressions in various cultivated *P. vulgaris* varieties. The use of 2D-immunedetection of specific insecticidal proteins has shown to be a simplified procedure to initially establish functional correlations between this group of proteins and the observed bruchid resistance phenotype.

Key Words: *Phaseolus vulgaris*; proteomics; lectines; arcelines; pest resistance; black beans.

1 Trabajo financiado parcialmente por el Subproyecto FONACIT-BID II N° 2004000410.

* Instituto Fundación de Estudios Avanzados (IDEA). Centro de Biotecnología, Lab. de Genómica y Proteómica. Carretera Hoyo de la Puerta, Sector Monte Elena, Baruta, Caracas 1080.

** Investigadora. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Zona Universitaria, Av. Universidad, vía El Limón. Apdo. 4653. Maracay 2101, estado Aragua Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El ataque de coleópteros de la familia bruchidae (*Zabrotes subfasciatus*, *Acanthocelides obtectus* y *Callosobruchus maculatus*) afecta la producción de caraota, *Phaseolus vulgaris* al provocar importantes pérdidas en los granos durante su almacenamiento. Algunos estudios han relacionado la presencia de ciertas proteínas de la familia de las lectinas, tales como las fitohemaglutininas (PHA), Arcelinas (Arc) e inhibidor de la α -amilasa (I α A), con una actividad insecticida en diferentes variedades de este rubro (Osborn *et al.*, 1988; Chrispeels y Raikhel, 1991; y Lioi *et al.*, 2003), pero se han centrado principalmente en el análisis individual de cada una de ellas. En el presente trabajo se utiliza la proteómica como una herramienta para estudiar las relaciones en la expresión de estas proteínas de resistencia en diversos materiales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron extracciones de proteínas de los endospermos de diversos materiales de *P. vulgaris* en Buffer borato de sodio 20 mM pH 9, incubando 1g de harina a 37 °C durante 1 hora, en presencia de inhibidores de proteasas. Se centrifugó la mezcla a 14 000 rpm por 15 min y se tomaron los sobrenadantes. Para la determinación de proteínas de los extractos se utilizó el método de Bradford (1976). Se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970) y electroforesis bidimensionales en el rango de pH NL 3-10 y SDS-PAGE al 12% teñidos con plata.

Para el análisis por inmunoensayo se realizó la transferencia de los geles bidimensionales a membranas de nitrocelulosa y se revelaron de acuerdo a la metodología descrita por Brunette (1981), empleando un antisuero de conejo específico contra Arcelinas, PHA e I α A (1:6000), y como anticuerpo secundario IgG anti-conejo unido a peroxidasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado de la extracción de proteínas de un total de 32 accesiones de *P. vulgaris* provenientes del Banco de germoplasma del INIA-CENIAP

(Maracay), fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE 12%, permitiendo una primera selección de dos materiales con base en los patrones unidimensionales que arrojaron estos granos. Se realizaron las electroforesis bidimensionales de ambos materiales y se procedió a un análisis más específico de las proteínas de interés realizando la inmunodetección con un antisuero que permite evidenciar la presencia y patrón de expresión de las fitohemaglutininas (55-65 kDa), arcelinas (31-40 kDa) e inhibidor de α -amilasa (15–18 kDa) presentes.

Los resultados alcanzados permitieron obtener los proteomas correspondiente a las muestras seleccionadas de *P. vulgaris*, donde se hacen evidentes diferencias globales entre el total de proteínas reveladas en geles bidimensionales para cada muestra, así como proteínas o grupos de proteínas presentes en un material y ausentes en el otro (Ver Figura).

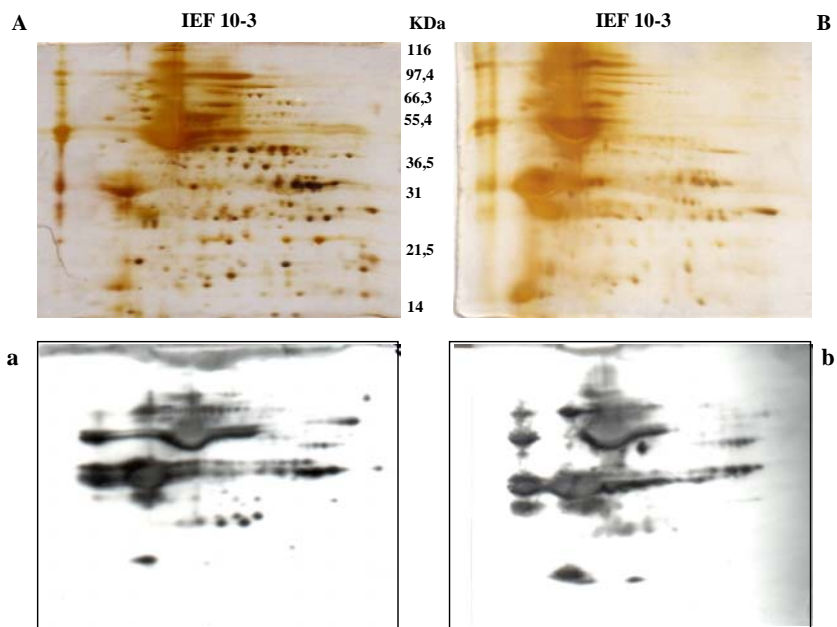


FIGURA. (A, B) Gel 2D 12% de dos variedades de *P. vulgaris* (a, b). Inmunoblot 2D con el antisuero específico contra proteínas de la familia de las lectinas.

Por otra parte, el inmunoensayo sobre los geles bidimensionales permite una rápida evaluación de un conjunto de proteínas a las que se les asocia una actividad insecticida y que pertenecen a la familia de las lectinas. Este estudio comparativo permitió, de una manera sencilla, abordar el análisis integral de estas proteínas insecticidas en *P. vulgaris*, procedimiento éste que podría erigirse como una estrategia útil para relacionar la presencia o expresión diferencial de estas lectinas con la resistencia o susceptibilidad a plagas durante el almacenamiento del grano.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Roberto Bollini del Instituto de Biología y Biotecnología Agraria (Milan, Italia) quien gentilmente suministró el antisuero contra la familia de lectinas utilizado para los inmunoensayos en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:278-84.

BRUNETTE, W. 1981. Western Blotting electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.

CHRISPEELS, M. and N. RAIKHEL. 1991. Lectins, lectins genes and their role in plant defense. *Plant Cell.* 3:1-9.

LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227:680-685.

LIOI, L., F. SPARVOLI, I. GALASSO, C. LANAVE and R. BOLLINI. 2003. Lectin related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theo. Appl. Gen.* 107:814-822.

OSBORN, T., D. ALEXANDER, S. SUN, C. CARDONA and F. BLISS. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of Arcelin seed proteins. *Sci.* 240:207-210.

MICROPROPAGACIÓN DE *Musa* spp. (PLÁTANO var. MANZANO AAB) A PARTIR DE MERISTEMAS FLORALES

Gladys Molina*, María Vielma T.*,
Melangel Tacoronte* y Máximo Briceño**

RESUMEN

Los bananos y plátanos son rubros alimenticios de gran importancia económica en Venezuela, y han sido considerados como alimentos de elevado consumo nacional. Uno de los objetivos fundamentales de la tecnología de avance aplicada a la agricultura, es generar aumentos sustanciales en la producción y/o rendimiento de este rubro a través de nuevos enfoques, permitiendo la expansión de la superficie sembrada. El objetivo principal de la investigación es Micropropagar plantas de *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) a partir de meristemas florales masculinos. Esta investigación se realizó en seis etapas, empleando el medio de Murashige y Skoog (MS) en 1962 y de Schenk y Hildebrandt (SH) en 1986, con diferentes concentraciones hormonales y condiciones de cultivo. **Etapa I:** establecimiento de ápices de inflorescencias masculinas de 1,1 cm en MS1– control. **Etapa II:** inducción de primordios en MS modificado (MS2) a dos concentraciones de benciaminopurina (BAP: TI=1,5 y TII=3 mg l⁻¹) y control (MS1). **Etapa III:** expresión de primordios en medio SH + 3,2 µM BAP (MS3). **Etapa IV:** desarrollo y alargamiento de primordios en medio MS4 (MS +1,5 mg l⁻¹ ANA). **Etapa V:** enraizamiento de vástagos en medio ½ MS + 1 mg l⁻¹ ANA (MS5). **Etapa VI:** aclimatación de las plantas. Se observó que en *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) es posible obtener plantas a través de inflorescencia masculinas. La inducción de primordios de vástago se produjo en TI, TII y control. De acuerdo al análisis estadístico hay diferencias significativas entre el control, TI y los tratamientos TI y TII, indicando que la presencia de BAP es indispensable en el medio para inducir primordios de vástago.

Palabras Clave: *Musa*; inflorescencia; primordios; plátano.

* Ingeniero Agrónomo, Profesor y Asistente de Laboratorio, respectivamente. Universidad de Los Andes (ULA). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro*. 5101.
E-mail: gjmr23@hotmail.com - mvielma1@ula.ve - tacoront@ula.ve

** Profesores. Instituto Politécnico Santiago Mariño. Estado Mérida. Venezuela.
E-mail: kantbrin@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

MICROPROPAGATION OF *Musa* spp. (PLÁTANO var. MANZANO AAB) FROM FLORAL MERISTEMS

Gladys Molina*, María Vielma T.*, Melangel Tacoronte*
y Máximo Briceño**

SUMMARY

The Bananas and plantains are nutritional species of economic importance in Venezuela, and have been considered as nutriment national consumption. One of the main objectives of technologies applied to agriculture is to generate substantial increases in the production and/or efficiency of these species through new approaches, allowing the expansion of the seeded surface. The primary target of the investigation is Micropropagate plants of *Musa* spp. (var. manzano Banana AAB) from floral masculine meristems. This investigation was performed in six stages, using the medium of Murashige and Skoog MS in 1962 and Schenk and Hildebrandt SH in 1986, with different hormonal concentrations and conditions of culture. **Stage I:** establishment of apexes of masculine inflorescences of 1.1 cm in MS1-control. **Stage II:** induction of buds in modified MS (MS2) to two concentrations of benzilaminopurine (BAP: TI=1.5 and TII=3 mg l⁻¹) and control (MS1). **Stage III:** expression of buds in the medium SH + 3.2 µM BAP (MS3). **Stage IV:** development and extension of buds in medium MS4 (+1,5 MS mg l⁻¹ ANA). **Stage V:** rooting of offshoot in medium ½ MS+1 mg l⁻¹ ANA (MS5). **Stage VI:** acclimatization of the plants. It was observed that in *Musa* spp. (Plantain var. Apple AAB) is possible to obtain masculine inflorescences. The induction of buds of offshoots took place in TI, TII and control. According to the statistical analysis there are significant differences between the control, TI and the treatments TI and TII, indicating that the presence of BAP in the medium is required to induce offshoot buds.

Key Words: *Musa*; inflorescence; buds.

* Ingeniero Agrónomo, Profesor y Asistente de Laboratorio, respectivamente. Universidad de Los Andes (ULA). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro*. 5101.
E-mail: gjmr23@hotmail.com; mvielma1@ula.ve; tacoront@ula.ve

** Profesores. Instituto Politécnico Santiago Mariño. Estado Mérida. Venezuela.
E-mail: kantbrin@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

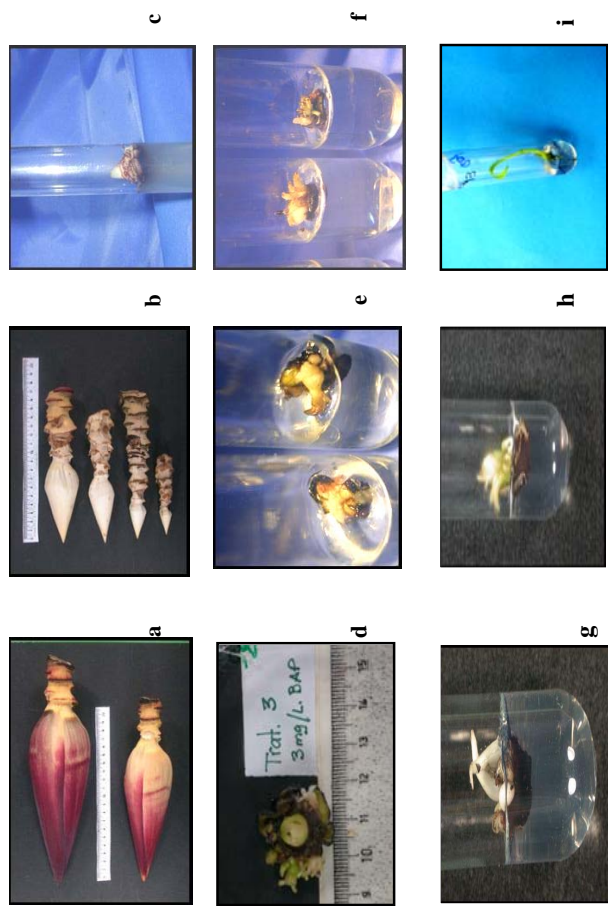
El cultivo de musáceas es de gran importancia debido a su valor nutritivo, donde destaca el contenido de carbohidratos (35%), que en parte son transformados a glucosa, sacarosa y fructosa durante la maduración, (6-7 % de fibra), (1-2% de proteína, potasio, magnesio, fósforo, calcio, hierro y vitaminas A y C), lo cual cubre las necesidades requeridas en la dieta básica de la población (Novak, 1992). Estudios de la FAO (1999), señalan que el grupo conformado por plátanos y cambures, conjuntamente con la leche, el trigo, y el arroz constituyen los cuatro alimentos más importantes del mundo. La misma fuente señala que por lo menos 400 millones de personas consumen el plátano y al cambur como alimentos básicos, siendo explotados por países en desarrollo en más de 8 millones de t/año.

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, han sido aplicadas en esta investigación para aumentar la propagación de plantas (“semillas”) de musáceas que puedan asegurar el mantenimiento de los cultivos y la obtención de plantas con características de interés (Roca y Mroginski, 1993; Novak, 1992; Sandoval, 2001; Colmenares y Giménez, 2003; Bustamante, 2004; Díaz, 2004). Además se estudia la factibilidad de proporcionar semilla viable, adaptada a las condiciones agroecológicas propias del municipio Alberto Adriani, estado Mérida y sus adyacencias, permitiendo la continuidad del suministro y el mantenimiento de las unidades de explotación, contribuyendo así al desarrollo sustentable de la región y del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las inflorescencias masculinas de *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) obtenidas de plantas vigorosas (Figura a, b) provenientes de diferentes unidades de producción, del municipio Alberto Adriani; fueron previamente limpiadas y sumergidas en una solución estéril de ácido ascórbico 500 mg l⁻¹, durante 15 min. Posteriormente los raquis obtenidos fueron esterilizados en una solución de hipoclorito de sodio al 2% más dos gotas de Tween 20, durante 5 min y suave agitación, luego se lavaron con agua destilada estéril.

Se removieron las brácteas hasta lograr una longitud del raquis de 1,1 cm (Figura c) con ápice (explante) de 0,5 mm de longitud y sumergidos en ácido ascórbico 250 mg l⁻¹ antes de cultivarlos.

**FIGURA.**

Inflorescencia masculinas (bellotas) de *Musa* spp. (Plátano variedad Manzano AAB). a) Bellota con el caquis recortado para conservar a 5 °C. b) Etapas y longitud de la inflorescencia antes de la siembra. c) explante cultivado en tubo de cultivo con medio MS1. (Etapa I). d) Explante con estructuras de primordios de vástago desarrolladas entre las axilas de las brácteas. (EtapaII) e) Primordios individualizadas f) Proliferación en racimo. (Etapa III). g) Primordio alargado albino. h) Primordio alargado y con desarrollo del sistema fotosintético (Etapa IV) i) Plántula con sistema radicular (Etapa V).

Etapa I o Establecimiento del cultivo: los explantes se cultivaron en tubos de cultivo sigma® C-5916 con 15 ml de medio Murashige y Skoog (1962; MS1 Cuadro 1) y 0,8% de agar (Figura c).

Etapa II o Inducción de primordios: los explantes establecidos fueron cultivados en el medio MS2, (MS1 con dos concentraciones BAP (TI = 1,5 mg l⁻¹ y TII = 3 mg l⁻¹) manteniendo el control (MS1).

Etapa III o de expresión de primordios: una vez inducidos, los explantes fueron colocados en medio de germinación de Shenk y Hildebrant (1985; SH) Ç;Ç citado en Roca y Mroginski (1993) en el Cuadro 2 suplementado con 3,2 µM de BAP (MS3). Figuras d,e,f. Las condiciones de incubación para estas etapas fueron 12 h luz, 12 h oscuridad, a 27 °C.

Etapa IV o de desarrollo y alargamiento: en la semana 12 los explantes desarrollados y alargados, se individualizaron; y fueron cultivados en MS1 suplementado con 1 mg l⁻¹ ANA y 2% de gelrite, (MS4) durante (04) semanas (Figuras g, h).

Etapa V o de enraizamiento: los primordios de vástagos desarrollados fueron subcultivados en medio MS ½ (MS5) Figura i, durante 8 semanas, fotoperíodo de 16 h luz y 14 h de oscuridad a 27 °C, logrando el desarrollo del sistema radicular.

Etapa VI o aclimatación: una vez desarrolladas las plantas y con una longitud promedio de 12 cm se cultivaron en sustrato arena y compost en una proporción 1:1. Para el análisis estadístico se realizó comparando las medias obtenidas a través del test de Tukey y utilizando el programa ç Statistic versión 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el establecimiento de la micropropagación *in vitro*, entra en juego una interacción explante – medio de cultivo – concentraciones fitohormonales y condiciones ambientales (fotoperíodo, temperatura, humedad relativa) según Tacoronte (1997), lo que se pudo corroborar en este trabajo. Al analizar las diferentes etapas del cultivo se detectó que en la etapa I, el explante manifestó adaptación y estabilidad fisiológica, vigorosidad y aumentó su diámetro, coincidiendo con Sandoval (1985).

CUADRO 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Compuestos	mg l ⁻¹
Nitratos:	
NH ₄ NO ₃	10
KNO ₃	
Sulfatos:	
MgSO ₄ .7H ₂ O	
MnSO ₄ .4H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	
CuSO ₄ .5H ₂ O	
Haluros:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	
KI	10
CoCl ₂ .6H ₂ O	
Micronutrientes:	
KH ₂ PO ₄	
H ₃ BO ₃	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	
FeSO ₄ .7H ₂ O	
Na ₂ EDTA	10
Myo-inositol	10
Acido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina HCL	1
Glycina	1
Sacarosa 3%	30g l ⁻¹
Agar 0,8 % - 1 %	

El explante responde a la inducción hormonal con la citoquinina y entre 12 y 14 semanas, se observó el desarrollo de los primordios inducidos por la presencia de la estructuras meristemoides, llamadas así por Zamora *et al.* (2002); y definidas como primordios por Cronauer y Krikorian (1985). Estas estructuras blanquecinas, ovaladas y consistentes aparecieron entre las axilas de las brácteas y las estructuras florales; Figura (d,e) características observadas también por, Cronauer y Krikorian (1985).

En el tratamiento TII se produjeron 53 primordios, mientras que TI

CUADRO 2. Composición del Medio de cultivo Schenk e Hildebrandt (SH 1985).

Compuesto	mg l ⁻¹
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
CaCl ₂ ·2H ₂ O	151
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400
KNO ₃	1 000
H ₃ BO ₃	0,1
CUSO ₄ ·5H ₂ O	0,2
Na ₂ EDTA	20,1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
KI	0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
Myo-inositol	1 000
Acido nicotínico	5
Piridoxina	0,5
Tiamina Hcl	5

presentó 24 primordios. En las semanas 14 y 15 para ambos tratamientos se presenta la máxima expresión de primordios, para TII (3 mg l⁻¹ BAP) con 62 primordios y TI (1,5 mg l⁻¹ BAP) obtuvo 58; a diferencia de Cronauer y Krikorian (1985) que observaron esta máxima expresión en la semana 18 con 5 mg l⁻¹ de BAP. Lo que indica que una alta concentración de la fitohormona pudiera estar retardando la respuesta.

De acuerdo al análisis estadístico (Cuadro 3) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos TI y TII, durante las semanas de producción de primordios. Lo que indica que las dos concentraciones de BAP utilizadas tienen la misma incidencia en la respuesta. Pero existen diferencias significativas (Cuadro 1) entre el tratamiento control y los tratamientos TI y TII. Lo que demuestra que se requiere la presencia de BAP para alcanzar la inducción de primordios.

En el ANOVA, para las semanas de muestreo se realizan pruebas

CUADRO 3. Medias de Primordios de *Musa* spp. (Plátano Variedad Manzano AAB) por tratamiento /semana.

	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16	Semana 17
Control	0,00±0,00 a	0,04±0,20 a	0,62±1,52 a	0,83±1,76 a	0,83±1,99 a	0,50±1,10 a
T-I	1,00±2,41 ba	1,87±230 b	1,83±2,46 a	2,41±2,76 ba	2,12±2,04 a	1,54±2,39 a
T-II	2,20±2,70 b	2,04±2,97 b	2,58±4,16 a	1,29±1,78 b	2,29±3,04 a	2,00±2,85 a

Los valores indican Promedio (X) ± Desviación estándar (DE). Las letras diferentes acompañando a los valores, indican que hay diferencia significativa entre medias, según el Test de Tukey (P<0,05). Fuente: Propia, (2005).

a posteriori de comparación de medias de Tukey y los tratamientos aplicados en la investigación al menos uno es diferentes para esas semanas de muestreo. Las tasas de proliferación de estos tejidos cultivados no son uniformes y dependen de factores como el tamaño del explante, la composición del medio y el estado fisiológico del tejido. Según Cronauer y Krikorian, (1983a), citado por Roca y Mroginski (1993) la inducción, el control del crecimiento y la morfogénesis están determinados por las relaciones hormonales suministradas en el medio de cultivo (sustrato). De esta manera pudo determinarse la obtención de plántulas mediante la técnica *in vitro* a partir de meristemas florales masculinos, promovidas por la presencia de Citoquinina BAP, en 28 semanas.

Los primordios, provenientes del tratamiento TII, una vez individualizados y cultivados en el medio MS4 con 1,5 mg l⁻¹ de ANA, se alargaron y desarrollaron el aparato fotosintético, presentando características de un vástago, mientras que los primordios originados del TI, su alargamiento fue en menor proporción, lento y de color blanquecino (Figura h) dando una apariencia albina, igual que en el ensayo de Zamora (2002). Al disminuir la concentración ANA en el medio de cultivo, en los vástagos provenientes de TI y TII se indujo la formación de raíces. Las plantas fueron aclimatadas y actualmente se encuentran en evaluación en el campo.

BIBLIOGRAFÍA

BUSTAMANTE, R. 2004. Contribución a la Micropropagación clonal de *Musa* spp. (Plátano var. Hartón AAB) a través de ápices vegetativos. Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

CRONAUER, M. and D. KRİKORIAN 1985. Determinate floral buds of plantain (*Musa* AAB) as site of adventitious shoot formation Ann of bot. 61:507-512. New York.

COLMENARES, M. y C. JIMÉNEZ 2003 . Nuevas estrategias para la inducción de brotes en *Musáceas*. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-065.pdf

DÍAZ, L. 2004. Optimización de la propagación de *Musa* (*Musa* sp. Var. Hartón AAB). Estudio de técnicas para la determinación somaclonal de plantas regeneradas. Mérida, Venezuela.

GIMÉNEZ, C. de GARCÍA E, N. XENA and I. BLANCO. 2001. Somaclonal variation in banana: Cytogenetic and molecular characterization of somaclonal variant *in Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37:217-222.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:474-497.

NOVAK, F. J. 1992. *Musa* (Bananas and plantain) **In:** Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Hammerschlag, F. A. and Litz, R.E.(Eds) C.A.B. International. Wallingford, Oxford, U. K. pp 488-499.

ORGANIZACIÓN PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 1999. <http://www.fao.org>.

ROCA, W. y L. MROGINSKI. 1993. Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Editores técnicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT) Cali, Colombia.

SANDOVAL, J. A. 2001. Manual Básico. Biotecnología aplicada para la Micropropagación de banana y plátano. (*Musa* AAA, AAB). Costa Rica. pp. 3-25.

TACORONTE, M. 1997. Cultivos *in vitro* una alternativa de propagación vegetativa en *Swietenia macrophylla king* (Caoba). Mérida, Venezuela.

ZAMORA, PAET, DAMASCO y De la CRUZ. 2002. *In vitro* conservation and cryopreservation in the Philippines. University of the Philippines at Los Baños, Los Baños, Laguna, Philippines. (IDIAP). <http://www.mida.gob.pa/idiap/biotec.html>.

ORGANOGENESIS DE RAÍCES EN GERANIO¹

Sandra Alva T.*, Maira Oropeza C.* y Teresa Edith Vargas C.*

RESUMEN

La inducción de formación de raíces mediante técnicas de cultivo *in vitro* se propone como una vía para la obtención de metabolitos secundarios de diferentes plantas en condiciones asépticas, representando una alternativa para las diferentes especies de geranio, apreciadas por sus cualidades medicinales. En *Pelargonium peltatum* la inducción hacia la formación de raíces fue observada al cultivar secciones de diferentes explantes en el medio con las sales Murashige y Skoog (MS) en 1962 suplementado con tiamina (0,4 mg l⁻¹), mio-inositol (100 mg l⁻¹), sacarosa (30 g l⁻¹), ácido ascórbico (100 mg l⁻¹), cisteína (50 mg l⁻¹), diferentes combinaciones hormonales y solidificado con agar (8 g l⁻¹), e incubadas bajo condiciones de luz. Las combinaciones hormonales empleadas para cada explante fueron: Para segmentos de hoja se empleó Cinetina (K, 5mg l⁻¹) + Ácido Naftaleno Acético (ANA, 1 mg l⁻¹); para segmentos nodales K (8 mg l⁻¹) + ANA (1 mg l⁻¹); para microesquejes Bencilaminopurina (BA 0,5 mg l⁻¹) y BA (2 mg l⁻¹) + Ácido Indol Acético (AIA, 0,2 mg l⁻¹). Bajo estas condiciones en todos los explantes probados se observó la formación de callo a la primera semana de cultivo. A los 3 meses se apreció el desarrollo de raíces en los diferentes explantes, encontrándose el mayor porcentaje de explantes con callo en los obtenidos a partir de secciones de hoja (73%), mientras que el mayor porcentaje de callo con formación de raíces se observó en los obtenidos a partir de microesquejes (100%).

Palabras Clave: Callo; raíces; cultivo *in vitro*; *Pelargonium peltatum*.

1 Esta investigación ha sido financiada por el consejo de Desarrollo científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, a través del Proyecto individual N° 03.33.5447.2004.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología. Centro de Botánica Tropical. Laboratorio de Biotecnología.
E-mail: moroπεζa@ciens.ucv.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ROOT ORGANOGENESIS IN GERANIUM¹

Sandra Alva T.*, Maira Oropeza C.* y Teresa Edith Vargas C.*

SUMMARY

The induction of roots by *in vitro* culture techniques is proposed as a method for the procurement of secondary metabolites from different plants species under aseptic conditions. For geranium, highly appreciated for its medicinal value, this represents an alternative. In *Pelargonium peltatum* the induction of roots was obtained culturing different explants on MS (1962) medium, supplemented with thiamine (0,4 mg l⁻¹), myo-inositol (100 mg l⁻¹), sucrose (30 g l⁻¹), ascorbic acid (100 mg l⁻¹), cysteine (50 mg l⁻¹), different growth regulators combinations, solidified with agar (8 g l⁻¹) and incubated under white fluorescent lamp. Hormonal combinations used for each explant were: for leaf segments Kinetine (K, 5 mg l⁻¹) + Naphtalenacetic acid (NAA, 1 mg l⁻¹); for nodal segments, K (8 mg l⁻¹) + ANA (1 mg l⁻¹); for microcuttings 6-Benzylaminopurine (BA, 0,5 mg l⁻¹); and BA (2 mg l⁻¹) + Indoleacetic acid (IAA, 0,2 mg l⁻¹). Under these conditions, callus tissue formation was observed for all treatments at the first week of *in vitro* culture. Three months later, development of hairy roots was observed on explants, finding the major percentage (73%) of explants with calluses for leaf segments cultured on SH medium, while, calluses originated from microcuttings cultured on ME1 medium showed the highest hairy root development (100%).

Key Words: Callus; root; *in vitro* culture; *Pelargonium peltatum*.

1 Esta investigación ha sido financiada por el consejo de Desarrollo científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, a través del Proyecto individual N° 03.33.5447.2004.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología. Centro de Botánica Tropical. Laboratorio de Biotecnología.
E-mail: moropez@ciens.ucv.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Todos los *Pelargonium* tienen su origen en África del sur, *Pelargonium peltatum* perteneciente a la familia Geraniaceae es conocida como geranio de hojas de hiedra. Su importancia no está basada sólo en su utilidad ornamental sino también medicinal y como aditivo en todo tipo de productos para el cuidado de la piel. Aranguren (2005), realizó un estudio en la región de Bailadores, en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida (Venezuela). De un total de 101 que son empleadas con fines medicinales el geranio fue incluido entre 20 especies medicinales de valor relativo importante.

Algunos químicos derivados de las plantas son fuente invaluable de una variedad de fármacos, condimentos, colorantes, aceites y resinas (Balandrin *et al.*, 1985). Muchos de estos fitoquímicos valorados comercialmente son metabolitos secundarios, producidos en pequeñas cantidades, y a menudo acumulados en tejidos específicos (Kim *et al.*, 2002).

En algunas especies de geranio apreciados por sus cualidades medicinales, los metabolitos secundarios son extraídos de las raíces. En condiciones *in vitro*, las raíces crecen lentamente a menos que una auxina exógena sea añadida al medio, el cultivo *in vitro* de raíces se propone como una vía para la obtención de material vegetal para la producción de fitoquímicos de interés en geranio. El objetivo de esta investigación es establecer las condiciones *in vitro* para inducir la formación de raíces en geranio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: se utilizaron como explantes discos de hoja de 0,8 cm², segmentos nodales de 1 cm y microesquejes de 1,5 a 2 cm. **Desinfección:** los explantes fueron desinfectados mediante lavado con agua y jabón comercial, seguido por un lavado con solución povidine (15 min), lavado con solución fungicida (VITAVAX, 30 min), lavado con cloro comercial (20%) y Tween 20, y por último tres enjuagues con agua destilada estéril bajo cámara de flujo laminar. **Medios de cultivo:** los explantes se cultivaron en los medios conformados por las sales Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementados con tiamina (0,4 mg l⁻¹), mio-inositol (100 mg l⁻¹), ácido ascórbico (100 mg l⁻¹), cisteína (50 mg l⁻¹),

sacarosa (30 g l⁻¹), y solidificado con agar (8 g l⁻¹). Los diferentes tratamientos empleados fueron los siguientes: Segmentos de hoja (SH) Cinetina (K, 5mg l⁻¹) + Ácido Naftaleno Acético (ANA, 1 mg l⁻¹); Segmentos nodales (SN) K (8 mg l⁻¹) + ANA (1 mg l⁻¹); Microesquejes, (ME1) BA 6-Bencilaminopurina (0,5 mg l⁻¹), (ME2) BA (2 mg l⁻¹) + Ácido Indol Acético (AIA, 0,2 mg l⁻¹).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo las condiciones anteriormente mencionadas, los explantes probados mostraron la formación de callo a la primera semana de cultivo; apreciándose a los 3 meses aproximadamente el desarrollo de raíces en los diferentes explantes; encontrándose el mayor porcentaje de explantes con callo en secciones de hoja (73%) en el medio SH (Cuadro). Así mismo, el mayor porcentaje de callo con formación de raíces se observó en el medio ME1 (100%, Cuadro). Saxena *et al.* (2000) en su experiencia mostraron que para inducir la formación de callo en los explantes se necesita colocar bajas concentraciones de auxina frente a la concentración de citoquinina.

CUADRO. Porcentajes de formación de callos y raíces en diferentes explantes y medios de cultivo a los tres meses de iniciado el cultivo.

Tratamientos	SH	SN	ME1	ME2
N° Explantes	60	52	34	20
% Explantes con callo	73	13	9	15
% Callo con formación de raíces	23	3	100	33

(SH) K (5 mg l⁻¹) + ANA (1 mg l⁻¹), explante hoja.

(SN) K (8 mg l⁻¹) + ANA (1 mg l⁻¹), explante segmento nodal.

(ME1) BA (0,5 mg l⁻¹), explante microesqueje.

(ME2) BA (2 mg l⁻¹) + AIA (0,2 mg l⁻¹), explante microesqueje.

En éste caso en todos los tratamientos se observó la formación de callo, pero sólo en el medio SH donde la proporción auxina-citocinina fue intermedia se obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo. Sin embargo, la organogénesis para la producción de raíces fue inducida en mayor porcentaje sólo en el tratamiento ME1, sin la presencia de auxina, debido posiblemente a que este tejido posee un alto contenido endógeno de la hormona. La Figura muestra la formación de callos y raíces en estos medios de cultivo.

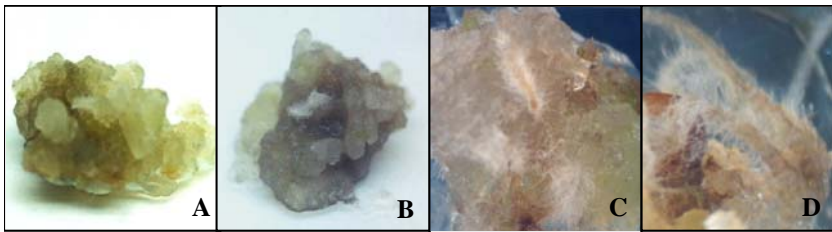


FIGURA. (A) Callos y raíces formadas en medio SN; (B) en medio SH; (C-D) Callos y raíces formadas en el medio ME1 y ME2.

BIBLIOGRAFÍA

ARANGUREN B., A. 2005. Plantas útiles empleadas por los campesinos de la región de Bailadores, Venezuela. *Boletín Antropológico*. Año 23, Nº 64, Mayo-Agosto, 2005. ISSN:1325-2610. Universidad de Los Andes. Mérida. 139-165.

BALANDRIN, M. F., J. A. KLOCKE, E. S. WURTELE and W. H. BOLLINGER. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228:1 154-1 160.

KIM, Y., B. WYSLOUZIL and P. WEATHERS. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactores. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:1-10.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:474-497.

SAXENA, G., S. BANERJEE, L. RAHMAN, G. MALLAVARAPU, S. SHARMA and S. KUMAR. 2000. An efficient *in vitro* procedure for micropropagation and regeneration of somaclones of rose scented *Pelargonium*. Plant Science 155:133-140.

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE DRASENAS

Galid Y. Pérez H.*, Claret C. Michelangeli de Clavijo**
y Ada M. Medina M.**

RESUMEN

Para el estudio de la morfogénesis *in vitro* de *Dracena sanderiana* se evaluaron dos tipos de explantes (tallo y hoja) con diferentes reguladores de crecimiento: 2,4-D (0,5; 1,0 y 1,5 mg l⁻¹) sólo o en combinación con 0,5 mg l⁻¹ de cinetina en oscuridad; y BA (0,5; 2,0 y 3,5 mg l⁻¹) suplementado con 200 mg l⁻¹ de mio-inositol bajo iluminación artificial; todos en medio MS y a 29±2 °C. Los resultados indicaron que el uso de 2,4-D sólo a concentraciones de 0,5 mg l⁻¹, indujo la formación de callos y raíces a los 60 días de cultivo a partir de explantes de tallo. En combinación con cinetina se formaron callos en explantes de tallo y vaina foliar, pero en muy bajo porcentaje (20%). En explantes de tallo con yema, se indujo la formación de brotes en los medios suplementados con BA y testigos; mientras que a mayor concentración de BA, mayor número de brotes por explante, pero de menor tamaño. A los 210 días de cultivo, los brotes obtenidos fueron enraizados tanto *in vitro* (MS suplementados con ANA a 0,5 mg l⁻¹), como *in vivo* (inmersión breve en una solución de ANA (0,5 mg l⁻¹) y colocados en sustrato Sunchine). Bajo condiciones *in vitro* se indujeron raíces en un 40-80%, mientras que *in vivo* las raíces se presentaron en todos los brotes, excepto aquellos provenientes del tratamiento con BA de mayor concentración, probablemente debido a un efecto residual de BA, presentándose mayor número de raíces en los brotes de mayor tamaño (>4cm).

Palabras Clave: *Dracena sanderiana*; cultivo *in vitro*; morfogénesis.

* Asistente de Proyecto Bioseguridad MARN. Tesis de grado.

** Directora y Profesora. UCV. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola e Instituto de Genética, respectivamente. Apdo.4579. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela. E-mail: clareniche@gmail.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

In vitro MORPHOGENESIS OF DRACENA

Galid Y. Pérez H.*, Claret C. Michelangeli de Clavijo**
y Ada M. Medina M.**

SUMMARY

In order to study *in vitro* morphogenesis of *Dracena sanderiana*, two different explants in MS medium at 29 ± 2 °C were evaluated. The effect of 2,4-D plant growth regulator alone (0,5; 1,0 and 1,5 mg l⁻¹) or in combination with kinetine (0,5 mg l⁻¹) in dark conditions, and BA (0,5; 2,0 and 3,5 mg l⁻¹) containing myo-inositol (200 mg l⁻¹) under illumination (16-h photoperiod) were tested. Shoot explants produced callus and roots on 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D medium after 60 days of cultivation. Callus tissue was formed on leaf sheath and shoot explants at a rate of 20% on a medium supplemented with 2,4-D and kinetine. On the other hand, adventitious shoot buds were developed on nodal explants both on a growth-regulator-free medium and BA-containing medium. At higher concentrations, BA enhanced the number of adventitious shoots but smaller in size. After 210 days, the regenerated shoots were rooted either on MS medium containing 0,5 mg l⁻¹, or briefly immersed in ANA solution of the same concentration and directly potted in a sterilized perlite-vermiculite mixture under mist conditions. The regenerated shoot buds cultured from 3,5 mg l⁻¹ BA medium failed to stimulate rooting, probably due to a residual effect of BA. However, all the other treatments were effective. Roots were formed at a 40-80% rate on ANA containing medium and up to 100% of the shoots rooted under mist conditions; the number of roots regenerated were highest when shoots were greater than 4 cm in length.

Key Words: *Dracena sanderiana*; *in vitro* culture; morphogenesis.

* Asistente de Proyecto Bioseguridad MARN. Tesis de grado.

** Directora y Profesora. UCV. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola e Instituto de Genética, respectivamente. Apdo.4579. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela. E-mail: claremiche@gmail.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las dráceas, *Dracena sanderiana* ocupan un lugar destacado como ornamentales de interior, debido principalmente a la facilidad de su cultivo y la notable variegación de sus hojas (Sánchez, 2002). Pertenecen a la familia botánica de las Agavaceae, nativa de Camerún y Congo. Incluyen un cultivar llamado ‘bambú de la suerte’ porque al deshojar los esquejes el tallo presenta un aspecto leñoso similar al del bambú y es símbolo de prosperidad y fortuna en países asiáticos. Otro cultivar es la ‘planta de la cinta’ que se caracteriza por poseer bandas blancas a lo largo de sus hojas (Inteliven.com, 2004).

En el país, estas plantas son importadas y colocadas a un alto costo directamente al consumidor. Son pocos los viveristas que cuentan con estos cultivares porque su propagación requiere estacas de tallo de al menos unos 10 cm de largo, lo que implicaría cantidades considerables de material vegetal (Sánchez, 2002).

Debido a la alta demanda, su propagación *in vitro* podría generar una producción acelerada de plántulas, aumentando el número de plantas madres o el número de cultivares en espacios reducidos (Roca y Mroginski, 1991). En este sentido, se tiene por objetivo evaluar la regeneración directa o indirecta de esta especie mediante técnicas de cultivo de tejidos y determinar la respuesta de enraizamiento de los brotes obtenidos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron explantes de hojas y tallos de la parte apical de plantas jóvenes propagadas por estacas, creciendo en viveros comerciales. Previa desinfección con hipoclorito de sodio al 2,0%, se tomaron porciones de 1,0 cm² de hoja (tanto de la vaina como de la lámina) y de discos de 3 mm de tallo; las cuales fueron incubadas en medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962), a tres concentraciones de 2,4-D (0,5; 1,0 y 1,5 mg l⁻¹) para el primer experimento (I), y con estas tres concentraciones de 2,4-D en combinación con una única de cinetina (0,5 mg l⁻¹) para el segundo (II); todas complementadas con 2,0 mg l⁻¹ de caseína hidrolizada, bajo condiciones de oscuridad a 29±2 °C por 160 días. Así mismo, para el tercer experimento (III) se usaron secciones de tallo con nudos, que se

colocaron en medio MS suplementado con BA (0,5; 2,0 y 3,5 mg l⁻¹) con mio-inositol a 200 mg l⁻¹.

A los 60 días fueron transferidos a medio fresco bajo iluminación fluorescente a 20 µmol m²s⁻¹ con un fotoperíodo de 16 horas y a una temperatura de 29 ± 2 °C; posteriormente, a los 210 d se pasaron a medio de enraizamiento *in vitro* (MS + ANA 0,5 mg l⁻¹) e *in vivo* (sustrato estéril de vermiculita y perlita, previamente sumergidos en ANA (0,5 mg l⁻¹) por 10 segundos aplicando riego con propagador de neblina). Para la evaluación de todos los ensayos se usó un diseño completamente aleatorizado, con tres tratamientos más un testigo y 10 repeticiones por tratamiento. Para los experimentos I y II, la unidad experimental estuvo constituida por tres explantes por cápsula de Petri; mientras que para el experimento III la undiad experimental estuvo constituida por cuatro frascos, con un explante por frasco.

Las variables evaluadas fueron: número de explantes con callos, diámetro mayor del callo, tamaño y número de brotes y número de raíces/explante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los explantes provenientes de lámina foliar no produjeron callos en ninguna de las concentraciones de 2,4-D utilizadas, solas o en combinación con 0,5 mg l⁻¹ cinetina. Por el contrario, los explantes provenientes de tallo y vaina foliar expresaron su capacidad morfogénica con la presencia de callos y raíces. Cuando se usó 2,4-D a concentraciones de 0,5 y 1,0 mg l⁻¹, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos y los callos obtenidos fueron similares a los descritos por Vinterhalter (1989) y Chua *et al.* (1981), de color amarillento, apariencia granulosa y compactos ver (Figura a).

Según prueba de Tukey, la adición al medio de 2,4-D en bajas concentraciones, resultó en una mayor cantidad de explantes con callos, mayor tamaño de los mismos y mayor número de raíces/explante (ver Figura b) según se observa datos de Vinterhalter (1989) y Chua *et al.* (1981); las altas concentraciones de 2,4-D (1,5 mg l⁻¹), solo o en combinación con 0,5 mg l⁻¹ de cinetina, tendieron a inhibir esta expresión. En consecuencia, los explantes provenientes de tallo presentaron mejor respuesta morfogénica, aún cuando no se observó regeneración de plantas.

Por otra parte, con el uso de BA en el medio se formaron brotes a partir

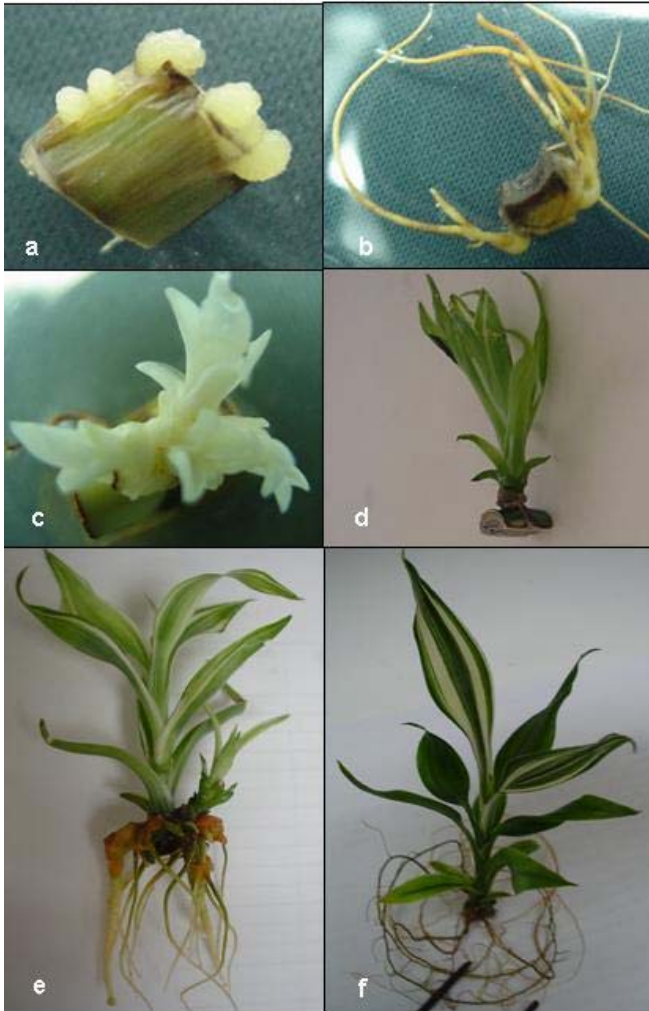


FIGURA. Morfogénesis *in vitro* de dracena. a) Callo formado a los 100 días de cultivo a partir de explantes de tallo en $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D; b) Raíces formadas a los 100 días de cultivo en $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D; c) Numerosos brotes obtenidos en $3,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA; d) Brote obtenido en $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA; e) Brotes enraizados en $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ANA a los 110 días de cultivo f) Brote enraizado a los 110 días en condiciones de invernadero.

de segmentos nodales, los cuales incrementaron su tamaño posterior a los 60 días de cultivo. Las pruebas de Kruskal y Wallis detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para la variable número de brotes. Se pudo observar que a mayores concentraciones de BA, aumentó el número de brotes (hasta 8 brotes/explante) tal como se aprecia en la Figura c, mientras que a bajas concentraciones y en el testigo, sólo se formó un brote/explante ver (Figura d); lo cual evidenció la potencialidad que tiene la citocina en promover la división celular.

Al transferir brotes a condiciones de enraizamiento, se indujeron raíces en un 40 a 80% bajo condiciones *in vitro* (Figura e) y se presentaron raíces en todos los brotes en condiciones *in vivo* (Figura f), excepto aquellos provenientes del tratamiento con BA de mayor concentración, probablemente debido a un efecto residual de BA. El mayor número de raíces se obtuvo a partir de los brotes de mayor tamaño (>4cm); posteriormente, continuaron su crecimiento, formando hojas, engrosando su tallo y desarrollándose finalmente en plántulas.

AGRADECIMIENTO

Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Universidad Central de Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

CHUA, B. U., J. T. KUNISAKI and Y. SAGAWA. 1981. *In vitro* propagation of *Dracaena marginata* 'Tricolor'. HortSiencie 16(4):494-495.

INTELIVEN.COM. 2004. Nueva Era: Lucky bambú: felicidad no precedera, Online. Venezuela. Disponible en: <http://www.inteliven.com> Revisado: 14/01/2004.

MURASHIGE, T. and Y. SKOOG. 1962. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. PL. 15:473-497.

ROCA W. M. y L. A MROGINSKI. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia.

SÁNCHEZ, C. J. 2002. Las Drácenas. Online. España. Disponible en: <http://www.arbolesornamentales.com/dracenas.htm> Revisado: 01/07/2003.

VINTERHALTER, D. V. 1989. *In vitro* propagation of green- foliated *Dracaena fragans* Ker. Plant Cell, Tissue Organ Culture 17:13-19.

VARIACIÓN SOMACLONAL EN SEIS GENOTIPOS DE ARROZ¹

Gelis Torrealba*, **Efraín Salazar***, **Rosa Álvarez***,
Nelly Delgado*, **Rosana Figueroa****, **Orlando Moreno***,
Willian Castrillo*, **Edicta Reyes***, **Orlando Torres***,
María Navas*, **Margelys Salazar***, **Marco Acevedo***,
Edgar Torres***, **Paulo Abreu*** y **Carlos Gamboa†******

RESUMEN

El objetivo de la investigación se basó en utilizar Somaclones (S) de 6 genotipos de arroz, *Oryza sativa* L., mejorando algunas características agronómicas y de calidad de grano a través de variación somaclonal en la variedad CIMARRÓN[®] y las líneas avanzadas: “CT10310-15-3-2P-4-3”, “CT10338-16-1-1-1T”, “CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M”, “CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P” y “CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P”. Tres S de CT10310-15-3-2P-4-3, de 41 S evaluados en INIA Guárico, presentaron los mejores resultados para calidad de grano (mayor porcentaje de grano entero, centro blanco y yeso reducidos) y uno de estos S presentó además una reducción en la esterilidad de las espiguillas. La caracterización molecular fue realizada con marcadores RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar), llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del INIA-CENIAP. La temperatura de gelatinización de CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P mejoró, encontrándose S con valores intermedios. Cuatro S de CIMARRÓN mostraron menor porcentaje de infección con el virus de la hoja blanca, pasando de 75% de infección a un máximo de 30% de infección en los S. En los S de CT10338-16-1-1-1T no se obtuvo ninguno con resistencia completa al daño directo de sogata (*Tagosodes orizicolus*), sin embargo, algunos de ellos presentaron reacción intermedia al insecto. El 92,47% de los S de CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M resultaron resistentes al virus de hoja blanca. Los S del CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P evaluados en INIA Portuguesa tuvieron un comportamiento agronómico inferior al testigo local.

Palabras Clave: Arroz; *Oryza sativa* L.; somaclón; RAPDs.

1 Financiado por INIA-FUNDARROZ.

* Investigadores. INIA. CIAE Guárico, CENIAP y CIAE Barinas, respectivamente. Venezuela. E-mail; gtorrealba@inia.gob.ve - esalazar@inia.gob.ve

** Profesora. UCV. Facultad de Agronomía. Núcleo Maracay. E-mail: figueroa@agr.ucv.ve

*** Investigador Fundarroz-FLAR (Venezuela- CIAT-Colombia).

**** Investigador. Fundación DANAC. San Javier, estado Yaracuy.

SOMACLONAL VARIATION OF SIX RICE GENOTYPES

Gelis Torrealba*, Efraín Salazar*, Rosa Álvarez*,
Nelly Delgado*, Rosana Figueroa**, Orlando Moreno*,
Willian Castrillo*, Edicta Reyes*, Orlando Torres*,
María Navas*, Margelys Salazar*, Marco Acevedo*,
Edgar Torres***, Paulo Abreu* y Carlos Gamboa†****

SUMMARY

The objective of this research was Somaclones of six genotypes of rice, *Oryza sativa* L., to improve some agronomic and grain quality characteristic of the following breeding lines: “CIMARRÓN”, “CT10310-15-3-2P-4-3”, “CT10338-16-1-1-1T”, “CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M”, “CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P” and “CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P”. Of 41 somaclones evaluated, three CT10310-15-3-2P-4-3 somaclones were found to have better grain quality, white belly reduction and decreased endosperm chalkiness and one somaclone, also showed lower panicle sterility when evaluated in INIA Guárico. Molecular differentiation was performed at the Biotechnology Laboratory of INIA-CENIAP, using random amplified polymorphism DNA (RAPDs). Gelatinization temperature of CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P improved, changing from low to medium. Four somaclones of CIMARRON showed reduced hoja blanca virus infection, from 75% infection in the check to a maximum of 30% of infection in the somaclones. Some somaclones derived from CT10338-16-1-1-1T showed intermediate reaction to direct damage caused by the brown plant hopper (*Tagosodes orizicolus*), no one was found to be completely resistant. About 92.47% of CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M somaclones were resistant to hoja blanca virus. Somaclones from CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P evaluated in INIA-Portuguesa had an inferior agronomic behavior.

Key Words: Rice; *Oryza sativa* L.; somaclone; RAPDs.

1 Financiado por INIA-FUNDARROZ.

* Investigadores. INIA. CIAE Guárico, CENIAP y CIAE Barinas, respectivamente. Venezuela. E-mail; gtorrealba@inia.gob.ve - esalazar@inia.gob.ve

** Profesora. UCV. Facultad de Agronomía. Núcleo Maracay. E-mail: figueroa@agr.ucv.ve

*** Investigador Fundarroz-FLAR (Venezuela- CIAT-Colombia).

**** Investigador. Fundación DANAC. San Javier, estado Yaracuy.

INTRODUCCIÓN

La variación somaclonal (S) se puede definir como la variabilidad genética generada durante la práctica de cultivo de tejidos (Larkin y Scowcroft, 1981), la cual ofrece nuevas alternativas en el campo de mejoramiento genético. Involucra caracteres recesivos y variabilidad que puede ser diferente a la obtenida normalmente por los métodos convencionales (Schaeffer, 1982).

Puede resultar de gran utilidad en la incorporación o modificación de caracteres dentro de una variedad de arroz; puesto que puede generarse variabilidad genética vía somacultivo para características como la altura, número de macollas por planta y esterilidad de las espiguillas, mejorando significativamente el valor agronómico de la planta (Pachón, 1988); permitiendo exponer y recuperar cualquier variabilidad escondida en los genotipos, ofreciendo la posibilidad de inducir mutaciones.

A través de la variación S, se producen cambios genéticos heredables. Es un método simple y sencillo, usado en la biotecnología moderna. Varios S de seis genotipos de arroz, *Oryza sativa* L., obtenidos en el laboratorio de Cultivos de Anteras del Centro Internacional de Agricultura Tropical-Colombia (CIAT), fueron probados por el Plan Nacional de Mejoramiento Genético de Arroz de Venezuela. El objetivo de la investigación fue el de mejorar algunas características agronómicas y de calidad de grano a través de variación en la variedad CIMARRÓN y las líneas avanzadas: CT10310-15-3-2P-4-3, CT10338-16-1-1-1T, CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M, CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P y CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante 1998 fueron obtenidos en el CIAT-Colombia varios S a partir de 6 genotipos de arroz: CIMARRÓN, CT10310-15-3-2P-4-3, CT10338-16-1-1-1T, CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M, CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P y CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P; los cuales posteriormente se evaluaron bajo las condiciones de Venezuela.

Cada grupo de S se evaluó para el factor por el cual fueron sometidos a variación S bajo condiciones controladas en Colombia y de campo en Venezuela, además de las características morfológicas, fisiológicas y

agronómicas de las plantas así como la reacción a plagas y enfermedades de acuerdo al Sistema Internacional de Evaluación del Arroz del IRRI (1996, 2002).

Para determinar esterilidad en las panículas de CT10310-15-3-2P-4-3, fueron cosechadas 10 panículas/somaclon en ensayo establecido en los Bancos de San Pedro, Calabozo (INIA Guárico), bajo un diseño completamente aleatorizado con 50 plantas/somaclón, determinándose el número de granos llenos y granos vanos, respectivamente. La diferenciación molecular de tres de estos S y el testigo fue realizada con marcadores RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar), llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del INIA-CENIAP, en el 2004. Para la evaluación de acame, el ensayo fue establecido en el campo experimental de INIA Portuguesa bajo un diseño de bloques de Federer, con unidad experimental de 8 m², empleando como testigo al cultivar que le dio origen y Cica 8 por presentar problemas de vuelco (acame).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuatro de CIMARRÓN mostraron significativamente un menor porcentaje de infección con el virus de la hoja blanca, pasando de 75% de infección (testigo) a un máximo de 30% de infección en los S (Cuadro 1).

CUADRO 1. Porcentaje de infección, somaclones (S) de Cimarrón.

Código	Replica 1(%)	Replica 2(%)	Replica 3(%)	Promedio
S-17	40,6	15,3	17,3	24,4
S-19	20,0	21,1	41,02	27,3
S-24	24,6	26,1	10,4	20,5
S-29	54,1	21,25	15,4	30,3
Cimarrón (Testigo)	74,0	73,9	76,0	74,6

Fuente: FLAR-CIAT.

Tres S de CT10310-15-3-2P-4-3, de 41 evaluados en INIA Guárico (Cuadro 2), presentaron los mejores resultados para calidad de grano (mayor porcentaje de grano entero, centro blanco y yeso reducidos) y uno de estos S también presentó una reducción en la esterilidad de las espiguillas; cuya caracterización molecular fue detectada a través de RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar). El S 40 resultó el más bajo en esterilidad de panícula con un 17% en comparación con el testigo (36%).

CUADRO 2. Calidad de grano en los somaclones (S) del CT10310-15-3-2P-4-3.

Trat.	H%	Blanco Total %	G.E. %	G.P. %	Yeso %	G.P.+Y (%)	P.N. %	G.D %	Tipo
S4	12,19	69,30	61,00	1,00	1,20	2,20	0,40	0,40	I
S5	12,06	69,00	60,00	1,60	1,00	2,60	0,00	0,80	I
S40	11,19	68,20	63,00	0,80	1,00	1,80	0,00	0,80	I
Testigo	11,47	68,33	52,07	5,00	6,20	11,20	0,20	0,80	II

Trat.= Tratamiento; H= Humedad; G.E.= Granos enteros; G.P.= Granos Panza blanca; P.N.= Granos punta negra; G.D.= Granos dañados.

Fuente: Corina-Provenaca-INIA Guárico.

En los S de CT10338-16-1-1-1T no se obtuvo ninguno con resistencia completa al daño directo de sogata (*T. orizicolus*), aunque tienen buenas calificaciones en una o dos replicas, generalmente presentan una evaluación mala; sin embargo, muestran una con reacción intermedia al insecto, es decir, una mejor respuesta que la línea original.

El 92,47% de los S de CT9682-2-M-14-1-M-1-3P-M resultaron resistentes al virus de hoja blanca. En 146 S de CT9868-3-2-3-1-4P-M-1-3P mejoró la temperatura de gelatinización, encontrándose con valores intermedios, lo que significa que la técnica fue efectiva ya que el material original se presenta como de TG baja.

Los S del CT9509-17-3-1-1-M-1-3P-M-3-3P no presentaron acame, pero, tuvieron un comportamiento agronómico inferior al testigo local, por lo cual, fueron descartados. En cuanto a la caracterización molecular de los tres S de CT10310-15-3-2P-4-3, en la mayoría de los iniciadores utilizados los S presentan patrones de bandas similares entre sí y parecidas a las que exhibe el genotipo que les dio origen (T). Existen diferencias entre ellos, especialmente cuando se compara S5 con su progenitor; la muestra T en la mayoría de los casos siempre presentó patrones de bandas similares o idénticos al S4 y S40 que derivaron del mismo; estos resultados coinciden con Goodwin *et al.* (1997), los cuales estudiaron 8 familias de S de arroz, estableciendo polimorfismos que permitían identificar cada grupo mediante marcadores RAPD.

CONCLUSIONES

- Con los resultados antes expuestos se evidencia la aplicación de la variación S en el mejoramiento genético del cultivo arroz, la cual resultó más favorable para algunas características, especialmente aquellas relacionadas con la calidad de grano.
- En la mayoría de los iniciadores utilizados los S de CT10310-15-3-2P-4-3 presentaron patrones de bandas similares entre sí y parecidas a las que exhibe el genotipo que les dio origen, existiendo diferencias entre ellos, permitiendo confirmar la utilidad de RAPD para diferenciar S.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al FLAR/CIAT-Colombia: Dr. James Gibbons, Dra. Zaida Lentini; y a FUNDARROZ, por permitir la programación de obtención de Somaclones en el CIAT, y su evaluación en el Plan Nacional de Mejoramiento Genético de Arroz en Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

GODWIN, I. D., N. SANGDUEN, R. KUNANUVATCHAIDACH, G. PIPERIDIS and S. W. ADKINS. 1997. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. Indica) somaclonal progenies. Plant Cell Reports. 16(5):320-324.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). 1996. Standard evaluation System for rice. 4rd edition. The International Network for Genetic Evaluation of Rice (INGER), the International Rice Testing Program (IRTP), Philippines. 52 p. Version 2002 on line: www.knowledgebank.irri.org

LARKIN, P. J. and W. R. SCOWCROFT. 1981. Somaclonal variation- A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor.Appl.Genet.* 60:197-214.

PACHÓN G., J. 1988. Uso de la Variación somaclonal en el mejoramiento de algunos caracteres de importancia económica en el arroz (*Oryza sativa* L.). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al Título de Biólogo. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Biología. 131 p.

SCHAEFFER, G. W. 1982. Recovery of heritable variability in anther-derived doubled-haploid rice. *Crop Sci.* 22:1 160-1 164.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN SAMÁN

Rosalía Velásquez S.*, Jesús Colmenares*, Marilú Chirinos*,
Arnaldo Noguera* y Miguel Pérez*

RESUMEN

El samán, *Albizia saman*, es un árbol usado ampliamente, su madera es muy estimada en algunos lugares para la elaboración y tallado de muebles. El uso indiscriminado y la falta de programas de recuperación, renovación y mejoramiento de la especie ha ocasionado un deterioro a nivel genético haciéndolo susceptible al ataque de plagas y enfermedades. La embriogénesis somática (ES) se asoma como una alternativa para la propagación asexual de esta especie, ya que la semilla sexual presenta problemas de latencia y contaminación endógena. El objetivo de la siguiente investigación fue inducir la formación de callos y ES a partir de cotiledones y embriones cigóticos inmaduros en el medio de Murashige y Skoog, evaluándose dos tipos de reguladores: Citocinina (TDZ) y Auxina (2,4-D). La inducción de ES en samán se produjo en los cotiledones inmaduros implantados en el medio de cultivo constituido por las sales de Murashige y Skoog suplementado con 0,01 mg l⁻¹ TDZ y 30 gr l⁻¹ sacarosa, bajo condiciones de total oscuridad y 28 °C. Se demostró la influencia positiva de la citocinina en el desarrollo de ES en comparación con las auxinas.

Palabras Clave: *Albizia saman*; embriogénesis somática; TDZ.

* Personal Docente e Investigación. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO). Instituto de Genética. Laboratorio de Cultivo de Tejidos CIBA. Apdo. 4579. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN POD TREE

Rosalía Velásquez S.*, Jesús Colmenares*, Marilú Chirinos*,
Arnaldo Noguera* y Miguel Pérez*

SUMMARY

Pod tree has been largely used during the last years for its wood is highly appreciated for elaboration and design of household furniture. Indiscriminate used and the lack of recuperation, renewal and breeding programs have provoted damage at the genetic making the species more susceptible to pest and diseases. Somatic embryogenesis (SE) is a good alternative for asexual propagation, because seeds have too many problems with germination and endogen contamination. Callus and SE induction from immature cotyledon and embryos growing in MS medium and provided with two different grow regulators (auxins and cytokinins) were the objectives of study. The SE was induced from immature cotyledons, growing in MS medium supplemented with 0,01 mg l⁻¹ TDZ and 30 g l⁻¹ sucrose under dark condition and 28 °C. It was demonstrated that the cytokinins induce a better development of explant than the auxins.

Palabras Clave: *Albizia saman*; embriogénesis somática; TDZ.

* Personal Docente e Investigación. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO). Instituto de Genética. Laboratorio de Cultivo de Tejidos CIBA. Apdo. 4579. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El samán, *Albizia samán* (Jaack) F. Muell, es un árbol de rápido crecimiento en su ciclo vegetativo y puede alcanzar una altura entre 12,20 m y 15,20 m. Comúnmente es usado como árbol para pasto, sombra y ornamental, además de tener utilidad en la industria maderera. Este árbol originario del Nuevo Mundo es muy cultivado y usado en el Sur Este y el Sur de Asia, por lo que es a menudo equivocadamente considerado como nativo de esa área.

Aunque por lo general se le cultiva como árbol de sombra, su madera es muy estimada en algunos lugares para la elaboración y tallado de muebles (Roshetko, 1995). El uso indiscriminado del samán y la falta de programas de recuperación, renovación y mejoramiento de esta especie ha ocasionado un deterioro a nivel de su genética haciéndola susceptible al ataque de plagas y enfermedades. El mejoramiento de este cultivo es muy lento, debido a que poseen un ciclo de vida largo, una alternativa que pudiera ayudar en estos programas la representa la técnica de Cultivo de Tejidos mediante la obtención de embriones somáticos (ES; Skolmen, 1990).

La embriogénesis ocurre en células completamente aisladas bajo medios de cultivo ricos en auxinas, las cuales inducen la división celular, que luego se diferencian lentamente en un medio rico en citocinina (Ramis y Velásquez, 2001; Roca y Mroginski, 1991).

Las auxinas como regulador de crecimiento ha sido usada con éxito en algunas leguminosas como por ejemplo el maní, *Arachis hipogea*, donde el 2,4-D es el más efectivo. Se ha señalado la inducción de ES a partir de cotiledones inmaduros en especies de *P. sativum* y *Medicago sativa*, utilizando para ello el medio basal de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1 mg l^{-1} 2,4-D (Doorne *et al.*, 1994; Meijer y Brown, 1987).

Por otro lado, el thidiazuron (TDZ), siendo una citocinina, ha demostrado ser más efectivo que todos los tipos de adenina citokininas para la inducción de ES en varias especies de plantas, en especial en especies leñosas recalcitrantes (Brent, 2000; Mok *et al.*, 2000; Chávez *et al.*, 1998).

La presente investigación tuvo como objetivo inducir la formación de ES a partir de cotiledones y embriones cigóticos de samán, para ello se evaluó el efecto de una auxina (2,4-D) y una citocinina (TDZ) sobre la inducción y desarrollo de callos embriogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía.

Como explantes se utilizaron cotiledones y embriones cigóticos inmaduros extraídos de vainas inmaduras de 10 a 15 cm de largo. Las semillas extraídas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 50% durante 5 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril.

El tamaño de las semillas estuvo comprendido entre 1 y 0,5 cm de largo. Los cotiledones junto a los embriones fueron implantados en los dos tratamientos, uno conformado por las sales básicas de Murashige y Skoog, 30 g l⁻¹ sacarosa y 0,01 mg l⁻¹. TDZ (M1) y el otro igualmente constituido por las mismas sales, pero suplementado con 1mg l⁻¹ 2,4-D (M2). Una vez implantados los explantes en los tratamientos M1 y M2, se plantaron bajo condiciones de total oscuridad y temperatura de 28 °C. Se realizaron evaluaciones semanales, durante tres semanas, sobre el porcentaje de inducción de callos por tratamiento. Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar.

Una vez inducida la formación de callos, los mismos fueron transferidos a un medio compuesto por las sales básicas de MS, 30 gr l⁻¹ sacarosa y 0,005 mg l⁻¹ TDZ (M3), para inducir la formación de ES.

Corte anatómicos fueron realizados con el objeto de determinar la presencia de ES en cada tratamiento. Los callos de apariencia embriogénica fueron fijados en una solución de FAA 70% por 24 horas; luego se sometieron a una batería de deshidratación con alcohol terbutílico (50, 70, 85, 95 y 100% de concentración), para ser incluidos en parafina. La tinción se realizó con safranina 1% y fast green 0,5%, permitiendo diferenciar las estructuras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al momento del primer conteo se pudo observar que la formación de callos fue casi total en la superficie de los cotiledones pequeños (0,5 cm), mientras que en los cotiledones grandes (1 cm) se desarrollaron callos sólo en el borde del cotiledón. El porcentaje de callos formados en los dos tratamientos se contabilizó en forma total para ambos tamaños de cotiledón. Sólo se observó un engrosamiento del embrión cigótico, no ocurriendo formación de callos en estos explantes, ya que los mismos se tornaron necróticos a los quince días de la implantación.

La formación de callos en M1, para ambos tamaños de cotiledón, fue mayor, lo que provocó en la mayoría de los casos la deformación del cotiledón (Figura 1a); lo contrario sucedió en el tratamiento M2 donde la formación de callos fue muy incipiente, presentándose sólo en el borde que mantuvo contacto con el medio de cultivo (Figuras 1b).

Se encontró, de manera global para ambos tamaño de semillas, un alto porcentaje de contaminación endógena (ver Cuadro) la misma debida a las condiciones en que se encontraban las plantas madres y el exceso de humedad del ambiente producto de las lluvias. No observándose diferencias significativas entre el tamaño del cotiledón y la incidencia de contaminantes, como ha sido referido para otros tipos de explantes. (Ramis y Velásquez, 2001; Brent, 2000; Roca y Mroginski, 1991).

Los callos provenientes del tratamiento M1 exhibieron poco brillo, de color blanquecino y apariencia friable, diferenciándose las masas proembriogénicas (Figura 1c). Por el contrario, los callos del tratamiento M2 presentaban una consistencia blanda, acuosa, que se deshacían al tomarlos con las pinzas.

A los 30 días de transferido los callos al medio M3 se observó la formación de ES en forma de corazón (Figura 2a) para todos los callos que provenían del medio M1. Resultados similares fueron observados en *Espiraea ulmaria* y *Cassia acutifolia* (Brent, 2000), ambas pertenecientes a la misma familia botánica del samán.

Los cortes anatómicos demostraron la presencia de tejidos conductores (Figura 2b) en los callos provenientes de ambos tratamiento (M1 y M2) además de la no conexión con el tejido parental adyacente, siendo esto un indicativo de la inducción de ES (Michelangeli de

Clavijo *et al.*, 2003); sin embargo, no se visualizó la formación de ES en la superficie de los callos implantados en el medio M2, esto probablemente sea producto de algún tipo de incompatibilidad entre la auxina utilizada en el tratamiento M2 (2,4D) y la presente en forma endógena

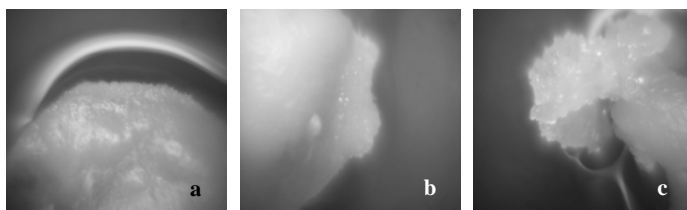


FIGURA 1. Desarrollo de callos. a) Callos desarrollados sobre el cotiledón tratamiento M1, b) Callos en el borde del cotiledón tratamiento M2, c) Masas Proembriogénicas.

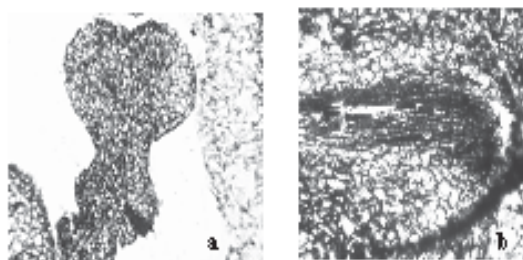


FIGURA 2. a) Desarrollo embrión somático fase de corazón, b) Diferenciación del tejido xilemático en las masas proembriogénicas.

CUADRO. Porcentaje de inducción de callos y contaminación por tratamiento.

Trat.	% callos formado		% callos formados	
	Long. 0,5cm	% Contaminación	Long. 1cm	% Contaminación
M1	75	25	67	33
M2	46	54	42	58

en el cultivo, retrazando de esta manera la formación de ES.

CONCLUSIONES

- El medio de cultivo formado por las sales básicas de MS suplementado con 0,01 mg l⁻¹ TDZ fue el que arrojó los mejores resultados para la inducción de ES. Ante estos resultados se infiere que los cotiledones inmaduros de samán deben poseer alta concentración endógena de auxinas, ya que el TDZ es capaz de movilizar las auxinas desde su sitio de producción y almacenamiento endógeno hacia los puntos donde sea requerido un proceso de división celular tal como fue señalado por (Brent, 2000; Mok *et al.*, 2000).
- El desarrollo de ES en fase de corazón y la presencia de tejidos conductores en los mismos, indica la posibilidad de diferenciación de esos embriones en una planta completa, por lo que se recomienda probar otros medios de cultivo para inducir el desarrollo de brotes y raíces.

BIBLIOGRAFÍA

BRENT, H. M. 2000. Recalcitrance of Woody and Herbaceous Perennial Plant: Dealing with Genetic Predeterminism. *In Vitro* Plant. 36:149-155.

CHÁVEZ, V. M., R. LITZ, M. MONROY and P. MOON. 1998. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cicadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature phase trees. *Olant Cell Report* 17:612-616.

DOORNE, LE VAN, G. MARSHALL and R. C. KIRKWOOD. 1994. Somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.): effect of explant, genotype and culture conditions.

MEIJER M, E. and W. BROWN. 1987. A novel sistem for rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plantarum* 69:591-596.

MICHELANGELI de CLAVIJO, C., P. ARTIOLI y A. MEDINA. 2003. Anatomía y ultraestructura de la embriogenesis somática en onoto (*Bixa orellana* L.). *Agronomía Trop.* 53(1):33-48.

MOK, M., R. MARTIN and D. MOK. 2000. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Plant* 36:102-108.

RAMIS, C. y R. VELÁSQUEZ. 2001. Introducción a la Biotecnología Agrícola. Guía Teórico Práctico. p. 85.

ROCA, W. y L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Editorial CIAT. Cali Colombia. p. 969.

ROSHETKO, J. M. 1995. *Albizia saman*: Mejoramiento de pastos, sombra, madera y más. Winrock Internacional. En línea: Revisado 18-04-05. www.winrock.org/forestry/factnet.htm.

SKOLMEN, R. G. 1990. *Pithecellobium saman* (Jacq.) Benth. Monkey-pod. *Hardwoods. Agric. Handb.* 654. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: p. 461.

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO RAPDs EFICIENTE PARA PLANTAS DE ÑAME

Maira Oropeza C.*, Erick A. Marilyn R.*
y Teresa Edith Vargas C.*

RESUMEN

Dada la importancia del cultivo de ñame, *Dioscorea alata* en Venezuela y el resto del mundo, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Central de Venezuela se logró establecer sistemas de regeneración *in vitro* para esta especie vía Organogénesis y Micropropagación. Basado en la posibilidad de evaluar la variabilidad genética de estas plantas, en el trabajo se estableció un protocolo de Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPDs) para el ADN de plantas de ñame. Esta investigación constó de 4 pasos: 1) Extracción del ADN: se realizó con el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990), modificado con tratamiento con solución limpiadora: (Etanol 76% en 10 mM (NH₄COOH)) y precipitación de oligosacáridos con Acetato de Amonio (NH₄COOH) 7,5 M; 2) Evaluación del ADN extraído: se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro según el protocolo planteado por Sambrook *et al.* en 1989; 3) Amplificación vía RAPDs del ADN extraído: según el protocolo planteado por Ramser *et al.* en 1997; 4) Comprobación de la amplificación del ADN extraído: en gel de agarosa 1,8%. Con las modificaciones aquí señaladas se logró obtener un protocolo adecuado de extracción y amplificación del ADN de *D. alata*.

Palabras Clave: ADN; *Dioscorea alata*; RAPDs.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental. Centro de Botánica Tropical. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ESTABLISHMENT OF AN EFFICIENT RAPD PROTOCOL FOR YAM PLANTS

Maira Oropeza C.*, Erick A. Marilyn R.*
y Teresa Edith Vargas C.*

SUMMARY

Because of the importance of yam, *Dioscorea alata* plants in Venezuela and the world, in the Plant Biotechnology Laboratory at the Universidad Central de Venezuela, *in vitro* culture systems via organogenesis and micropropagation for this plant species were established. Based on the possibility of evaluating genetic variability in regenerated plants, a protocol of Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) for yam plants was developed. This research was made up of four steps: 1) DNA extraction following Doyle and Doyle (1990) protocol modified with a cleaning treatment with 76% Ethanol in 10 mM NH₄COOH and oligosaccharides precipitation with 7,5 M NH₄COOH; 2) Spectrophotometric evaluation of extracted DNA according to Sambrook *et al.* (1989); 3) RAPD amplification of extracted DNA following the protocol established by Ramser *et al.* (1997) and 4) Verification of the amplification of extracted DNA using 1,8% agarose gel. Good quality *D. alata* DNA extracts and efficient DNA random amplifications were obtained using the modifications incorporated in our protocol.

Key Words: AND; *Dioscorea alata*; RAPDs.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental. Centro de Botánica Tropical. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El ñame, *Dioscorea alata* L, nativo de regiones cálidas de ambos hemisferios, es una de las especies más importante del género *Dioscorea*, dado su gran valor económico, farmacológico y alimenticio, cultivándose a través de los trópicos y en parte de las regiones sub-tropicales y templadas. Debido a la gran importancia de este género, Royero (2004), logró establecer sistemas de regeneración *in vitro* para esta especie.

El cultivo *in vitro* puede generar alteraciones genéticas que en su conjunto se denominan Variación Somaclonal (Larking y Scowcroft, 1981), por lo que se han desarrollado numerosas técnicas para evaluar este fenómeno. La técnica de RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) es una de las más eficientes y de mayor empleo para la detección de variaciones genéticas, no sólo de plantas regeneradas *in vitro* (Oropeza *et al.*, 1995), sino también en estudios de variaciones genéticas entre variedades de plantas de la misma especie (Oropeza y García, 1997). En el presente trabajo, se estableció un protocolo eficiente para la extracción y amplificación del ADN de plantas de ñame.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Hojas de plantas de *Dioscorea alata* en condiciones de vivero (*in vivo*), y hojas de plantas de *Dioscorea alata* regeneradas vía Organogénesis (*in vitro*). **Extracción de ADN:** Se realizó según el método Doyle y Doyle (1990) y se modificó según Weising y Kahl (1997). **Evaluación del ADN extraído:** Se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro, y se complementó con la electroforesis en gel de agarosa 0,8% para evaluar la integridad del ADN extraído, según Sambrook *et al.* (1989). **Amplificación del ADN extraído vía RAPDs:** Se realizó con primers pertenecientes a la serie OPC de la casa OPERON, según el protocolo planteado por Ramser *et al.* (1997), llevándose a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía: Buffer de reacción (1X); MgCl₂ (2 mM); dNTP's (0,2 mM); Iniciador (primer) (10 pM); ADN de *Dioscorea alata* (100 ng µl⁻¹); Taq Polimerasa (0,06 U. por reacción). Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por Ramser *et al.* (1997). **Comprobación de la amplificación:** Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,8%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar los resultados de la extracción del ADN de ñame, se encontró que este estaba contaminado con ARN, por lo que se decidió introducir la primera modificación al protocolo de extracción, la cual consiste de un tratamiento con RNAasa "A" (10 mg ml^{-1}) con lo cual se eliminó la contaminación de ARN en las muestras. Luego de esta modificación, al realizar la electroforesis en gel de agarosa, pudo observarse que todavía la muestra se quedaba retenida en los bolsillos del gel, hecho este que ponía en evidencia la presencia de oligosacáridos asociados al ADN extraído, por lo que se realizó la segunda modificación: Un tratamiento con solución limpiadora de los oligosacáridos: (Etanol 76% en 10 mM (NH_4COOH)) y su posterior precipitación con Acetato de Amonio (NH_4COOH) 7.5 M. La eliminación de estos oligosacáridos fue un paso sumamente importante, debido a que la presencia de estos no permitiría la posterior amplificación del ADN al evitar que los primers se unan a las cadenas del ADN extraído (Figura 1).

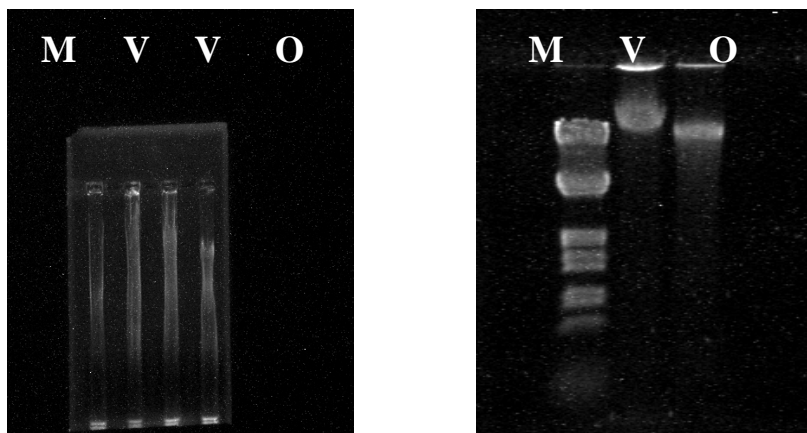


FIGURA 1. Evaluación de la integridad del ADN extraído. **Izq.:** Sin modificaciones; **Der.:** Luego de las modificaciones; **M:** marcador de peso molecular; **DNA:** Fago Lambda EcoR1 + Hind III (Promega); **V:** ADN de plantas *in vitro*; **O:** ADN de plantas *in vitro*.

Para que un ADN extraído presente suficiente pureza para ser amplificado, debe presentar valores entre 1,8 y 2 en la relación 260/280 al ser leído en un espectrofotómetro (Sambrook *et al.*, 1989), por lo tanto, luego de las modificaciones, se obtuvo un ADN de ñame apto para ser amplificado. Para evidenciar esto, se realizó la amplificación vía RAPDs del ADN de plantas de ñame *in vivo* y de plantas de ñame regeneradas *in vitro* vía Organogénesis, y al realizar la electroforesis en gel de agarosa 1,8% claramente se observó una amplificación efectiva (Figura 2), por lo que se dice que se obtuvo un protocolo eficiente de extracción y amplificación para el ADN de ñame.

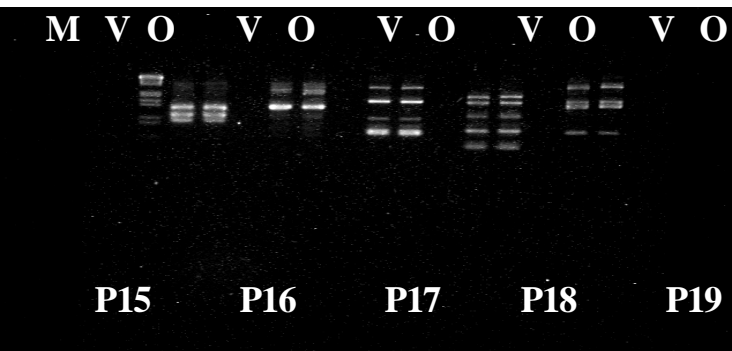


FIGURA 2. Comprobación de la amplificación vía RAPDs. M: Marcador de peso molecular; DNA: Fago Lambda EcoR1 + Hind III (Promega); V: ADN de plantas *in vivo*; O: ADN de plantas *in vitro* (Organogénesis); P15: Primer 15; P16: Primer 16; P17: Primer 17; P18: Primer 18. Todos los primers son de la serie OPC de OPERON.

BIBLIOGRAFÍA

DOYLE, J. J and J. L. DOYLE 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Phytochemical Bull.* 19:11-15.

LARKING, P. J and W. R. SCOWCROFT 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.

OROPEZA, M., P. GUEVARA, E. GARCÍA and J. L. RAMÍREZ 1995. Identification of Sugarcane *Saccharum* spp. Somaclonal Variants Resistant to Sugarcane Mosaic Virus, via Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13:182-191.

OROPEZA, M. y E. GARCÍA 1997. Utilización de marcadores moleculares para la identificación de variedades de caña de azúcar. *PHYTON*: 61:81-85.

RAMSER, J., K. WEISING, V. CHIKALEKE and G. KAHL 1997. Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. *BioTechniques.* 23:285-290.

ROYERO, M. 2004. Regeneración *in vitro* de *Dioscorea alata* (ñame). Trabajo Especial de Grado. Caracas. Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. pp. 82.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS 1989: Molecular cloning, a laboratory manual. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. pp. 6.60.

WEISING, K. and G. KAHL. 1997. Hybridization-based microsatellite fingerprint of plants and fungi. **In:** Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M., (Ed.). DNA markers. Protocols, applications and overviews. Wiley-VCH, New York. pp. 27-54.

MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE OCUMO Y TARO

Juan Matehus*, Gustavo Romay* y María A. Santana**

RESUMEN

El ocumo, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, y el taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott son plantas herbáceas de la familia de las Aráceas. Son plantas perennes que crecen en zonas tropicales, y cuya importancia radica en el consumo del cormo o tallo subterráneo modificado como órgano de reserva. El método de multiplicación comúnmente utilizado es por fracciones vegetativas, lo que conlleva a una baja tasa de multiplicación y a la dispersión de enfermedades. La importancia del establecimiento y multiplicación *in vitro* de plantas de ambas especies con el objeto de producir semilla libre de patógenos. El objetivo del trabajo fue estudiar las condiciones óptimas para la multiplicación *in vitro* de plantas de ocumo y taro. Cormos de ambas especies fueron sometidos a desinfección superficial con detergentes líquidos, alcohol y cloro comercial (2,5%). Para el establecimiento inicial de las especies, los meristemas fueron colocados en medio MS-2% sacarosa y concentraciones hormonales de 0,1 mg l⁻¹ bencil aminopurina (BAP) y 0,01 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA). En cuanto a la proliferación de brotes, se diseñaron medios de cultivo con 1 mg l⁻¹ BAP, 2 mg l⁻¹ BAP, 1 mg l⁻¹ BAP-3 mg l⁻¹ AG₃, 1 mg l⁻¹ BAP-0,05 mg l⁻¹ AG₃-0,02 mg l⁻¹ ANA y 1 mg l⁻¹ BAP-0,5 mg l⁻¹ AG₃-0,02 mg l⁻¹ ANA. Los resultados mostraron que la mejor tasa de proliferación se logra con el medio MS-2% sacarosa-1 mg l⁻¹ BAP con valores similares de las tasas de multiplicación en ambas especies (4,6-4,7 plántulas/explante/4 semanas). Los medios y las condiciones de cultivo señaladas han permitido la multiplicación rutinaria de las especies por un período mayor a los 4 años.

Palabras Clave: Micropropagación; cultivo *in vitro*; *Xanthosoma sagittifolium*; *Colocasia esculenta*.

* Profesional Asociado a la Investigación. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Biotecnología. E-mail: jmatehus@idea.org.ve, gromay@idea.org.ve

** Profesor Asociado. Universidad Simón Bolívar (USB). Departamento de Biología Celular. División de Ciencias Biológicas. E-mail: msantana@usb.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

***In vitro* MICROPROPAGATION OF COCOYAM AND TARO**

Juan Matehus*, Gustavo Romay* y María A. Santana**

SUMMARY

Cocoyam, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott and taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott are edible herbaceous plants of the Aracea family. They grow in the tropics and their modified stems or corms, are consumed as a staple due to their high starch content. The most common reproduction method for these species is by vegetative cuttings, with low propagation rates and disease dissemination, requiring the procurement of pathogen free plants of both species. The aim of this work was to study optimal conditions for *in vitro* micropropagation of cocoyam and taro plants. In order to reach the aim, corms of both species were surface sterilized with dish liquid detergent, alcohol and bleach (2,5%). To establish the species *in vitro*, meristems were cultured in MS-2% sucrose and 0,1 mg l⁻¹ BA - 0,01 mg l⁻¹ NAA. Shoot proliferation was induced in MS-2% sucrose media supplemented with 1 mg l⁻¹ BA, 2 mg l⁻¹ BA, 1 mg l⁻¹ BA-3 mg l⁻¹ AG3, 1 mg l⁻¹ BA-0,05 mg l⁻¹ GA3-0,02 mg l⁻¹ NAA y 1 mg l⁻¹ BA-0,5 mg l⁻¹ GA3-0,02 mg l⁻¹ NAA. Results showed that the best proliferation rates were obtained with MS-2% sucrose -1 mg l⁻¹ BA. Similar multiplication rates were obtained for both species (4,6-4,7 plants/explant/4 weeks). The methodology presented in this paper allowed the maintenance of cocoyam and taro for more than four years.

Key Words: Micropropagation; *in vitro* culture; *Xanthosoma sagittifolium*; *Colocasia esculenta*.

* Profesional Asociado a la Investigación. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Biotecnología. E-mail: jmatehus@idea.org.ve, gromay@idea.org.ve

** Profesor Asociado. Universidad Simón Bolívar (USB). Departamento de Biología Celular. División de Ciencias Biológicas. E-mail: msantana@usb.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El ocumo, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott y el taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, son plantas perennes de los trópicos y zonas húmedas pertenecientes a la familia de las Aráceas y consumidas por el hombre desde tiempos remotos por el alto valor nutritivo de sus cormos. Comúnmente se reproducen de forma vegetativa y una de las principales limitantes del cultivo es la carencia de semilla de alta calidad.

El cultivo *in vitro* ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de la productividad y la producción de material de siembra sano (García *et al.*, 1999). El objetivo del presente trabajo fue estudiar las condiciones óptimas para la multiplicación, crecimiento y mantenimiento de plantas *in vitro* de ocumo y taro (Montaldo *et al.*, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cormos de ocumo y taro fueron sometidos a desinfección superficial con detergentes líquidos, alcohol (70%) y cloro comercial (2,5%). Para el establecimiento *in vitro* de ambas especies, los meristemas fueron colocados en medio MS-2% sacarosa y concentraciones hormonales de 0,1 mg l⁻¹ bencil aminopurina (BAP) y 0,01 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA) por 8-12 semanas. Para la proliferación de brotes se evaluaron 5 diferentes medios de cultivo con 1 mg l⁻¹ BAP, 2 mg l⁻¹ BAP, 1 mg l⁻¹ BAP-3 mg l⁻¹ AG₃, 1 mg l⁻¹ BAP-0,05 mg l⁻¹ AG₃-0,02 mg l⁻¹ ANA y 1 mg l⁻¹ BAP-0,5 mg l⁻¹ AG₃-0,02 mg l⁻¹ ANA. Las condiciones de crecimiento durante todo el proceso fueron 26-30 °C y fotoperíodo de 12 horas luz 12 horas oscuridad (Murashige y Skoog, 1962). Posteriormente y de acuerdo a los resultados obtenidos en el primer ensayo en taro, se evaluó la tasa de proliferación de brotes para ocumo y taro bajo las mismas condiciones de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la fase del establecimiento *in vitro* hasta la fase de multiplicación de los explantes de ocumo y taro pueden observarse en la Figura 1.

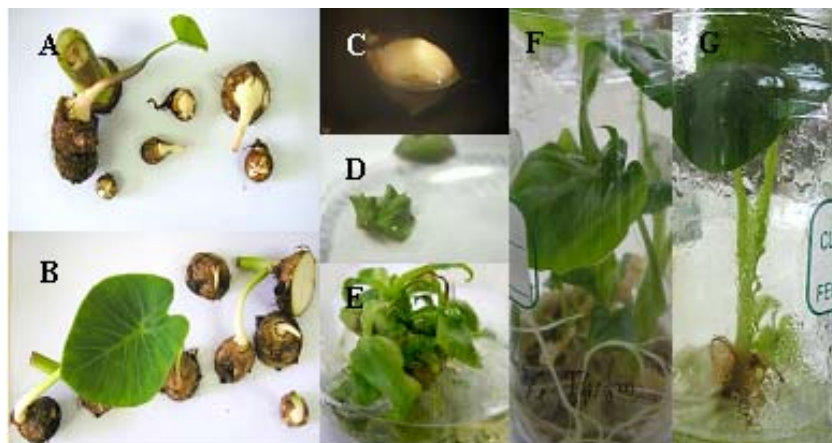
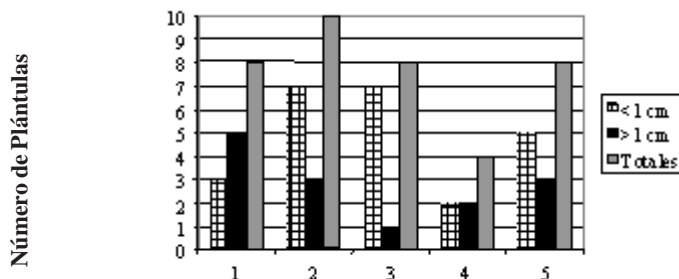


FIGURA 1. Registro fotográfico del establecimiento *in vitro* y multiplicación de plantas de ocumo, *Xanthosoma sagittifolium* y taro, *Colocasia esculenta*. **A:** Explante inicial de ocumo; **B:** Explante inicial de taro; **C:** Meristema de taro recién aislado; **D y E:** Brotes múltiples de ocumo en medio de proliferación conteniendo 1 mg l⁻¹ BAP; **F:** Planta de ocumo con 3 meses de cultivo; **G:** Planta de taro con 3 meses de cultivo.

En la Figura 2 se muestran los resultados del número de plántulas de taro producidas a las 8 semanas de su cultivo en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2% sacarosa y reguladores de crecimiento según los diferentes medios ensayados. Se puede observar que el medio suplementado con 2 mg l⁻¹ de BAP fue el que dio mayor número de brotes, sin embargo el suplementado con 1 mg l⁻¹ de BAP obtuvo el mayor número de plantas mayores de 1 cm, lo cual permite obtener plantas de mayor calidad manteniendo una buena relación del número de brotes por explante.

En el Cuadro se comparan las tasas de multiplicación estimadas del ocumo y taro, encontrándose valores promedio muy similares para ambas especies de 4,6 y 4,7 plantas/explante a las 4 semanas de cultivo, respectivamente. Trabajos con dichos cultivos muestran la idoneidad del uso del cultivo *in vitro* y la biotecnología para la producción de material de siembra sano y aumentar las tasas de multiplicación (Salazar, 1991;

García *et al.*, 1999). En el laboratorio la presente metodología ha sido utilizada para la multiplicación y mantenimiento de 4 variedades de Aráceas por más de cuatro años.



Medio

FIGURA 2. Número de plántulas de taro, *Colocasia esculenta*, producidas a las 8 semanas de su cultivo en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2% sacarosa y reguladores de crecimiento a las concentraciones siguientes: 1: 1 mg l⁻¹ BAP, 2: 2 mg l⁻¹ BAP, 3: 1 mg l⁻¹ BAP+ 3 mg l⁻¹ AG3, 4: 1 mg l⁻¹ BAP+ 0,05 mg l⁻¹ AG3 + 0,02 mg l⁻¹ ANA, 5: 1 mg l⁻¹ BAP+ 0,5 mg l⁻¹ AG3 + 0,02 mg l⁻¹ ANA. (n=3).

CONCLUSIONES

- El medio MS-2% sacarosa-1 mg l⁻¹ BAP permitió obtener tasas de proliferación promedio estimadas de 4,6 plantas/explante para taro y 4,7 plantas/explante para ocumo a las 4 semanas de cultivo.
- Los resultados obtenidos en este trabajo han contribuido a la limpieza, recuperación y colección *in vitro* de varios materiales pertenecientes a estas especies.
- Estas actividades forman parte de un programa de conservación de la biodiversidad y producción de semilla sana de raíces y tubérculos en Venezuela.

CUADRO. Número de plántulas de taro, *Colocasia esculenta* y Ocumo, *Xanthosoma sagittifolium* producidas en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2% sacarosa y 1 mg l⁻¹ BAP. PROM: promedio, DS: desviación estándar.

Plantas/ Experimento	Experimento (Días)	Plántulas <1 cm	Plántulas 1-2 cm	Plántulas >2 cm	Estimado de Plantas/ explantante/4 semanas	Promedio de Plantas/explante/4 semanas (Prom±DS)
Taro	8	3	21	10	3,1	4,63±1,41
	4	13	9	6	5,9	
	4	3	5	8	4,9	
Ocumo	6	6	14	7	4,5	4,73±1,17
	4	8	4	0	3,7	
	4	8	8	4	6,0	

BIBLIOGRAFÍA

GARCÍA, M., S. RODRÍGUEZ, V. MEDERO, J. LÓPEZ, J. VENTURA, M. CABRERA, A. RAYAS y D. GONZÁLEZ. 1999. Investigación Participativa en Fitomejoramiento y Producción de Semilla de Aráceas (*Xanthosoma* y *Colocasia*) Aplicando la Biotecnología. **In:** Simposio Internacional y Talleres sobre Fitomejoramiento Participativo en América Latina y el Caribe. <http://www.prgaprogram.org/cds/fmp/NADINE-PDF/GARCIA.pdf> (Página consultada en Octubre, 2005).

MONTALDO, A., J. MANTILLA, C. ZAMBRANO y P. ZÁRRAGA. 2004. Las aráceas comestibles: Ocumo y Taro. Luis Fuenmayor Toro, Editor. UCV. Ediciones OPSU. Primera Edición. Caracas, Venezuela. 1-250 pp.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-496.

SALAZAR, S. 1991. Micropropagación de aráceas comestibles. **In:** Roca, W y L. Mroginski (eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 469-480.

ULTRAESTRUCTURA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS Y NO EMBRIOGÉNICOS DE BANANO WILLIAMS (AAA, *Musa spp.*)¹

Maribel del C. Ramírez V.*, Eva de García** y Héctor J. Finol**

RESUMEN

Los estudios ultraestructurales durante la embriogénesis somática son muy importantes porque permiten comprender y mejorar este proceso morfogénético. De allí que este trabajo tuvo como objetivo caracterizar ultraestructuralmente callos embriogénicos (CE) y no embriogénicos (CNE) de banano Williams (*Musa spp.*). En células de ambos tipos de callos se observaron pared celular, membrana plasmática, citoplasma (retículo endoplasmático rugoso, membrana vacuolar, ribosomas y mitocondrias) y vacuolas. El contenido citoplasmático en el CNE fue menor y la pared celular delgada. Las células de CE resultaron pequeñas, isodiamétricas con citoplasma denso, vacuola pequeña y pared gruesa.

Palabras Clave: Embriogénesis somática; ultraestructura; *Musa spp.*

1 Trabajo financiado parcialmente por el FONACIT a través del Proyecto G 9 7000 700, otorgado a la Dra. Eva de García. Esta investigación forma parte del Proyecto de Tesis Doctoral "Caracterización morfoanatómica, ultraestructural y bioquímica de los procesos relacionados con la embriogénesis somática en *Musa spp.*".

* Estudiante de Postgrado en Botánica y Profesora del Departamento de Botánica. La Universidad del Zulia (ULA). Facultad de Agronomía. Apdo. 15205. ZU4005. E-mail: mcramire@cantv.net.

** Profesores. UCV. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental. ***Centro de Microscopía Electrónica (CME), respectivamente. Apdo. 47114. Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela. E-mail: egarcia@reacciun.ve / hfinol@electra.ciens.ucv.vede

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON EMBRYOGENIC AND NON EMBRYOGENIC CALLUSES FROM WILLIAMS' BANANA (*Musa spp.*)

Maribel del C. Ramírez V.*, Eva de García** y Héctor J. Finol***

SUMMARY

The ultrastructural studies of somatic embryogenesis are very important to understand and improve this morphogenetic process. In this sense the main objective of this research is the ultrastructural characterization of embryogenic and non embryogenic calluses from Williams' banana (*Musa spp.*). In the cells of both types of tissues, the cell wall (primary cell wall and middle lamella), plasma membrane, cytoplasm (endoplasmatic reticulum, vacuolar membrane and mitochondrias), and vacuoles, were observed. The CNE presented a less dense cytoplasm and thin walls. The CE showed small isodiametric cells, with small vacuoles and thick walls.

Key Words: Somatic embryogenesis; ultrastructure; *Musa spp.*

1 Trabajo financiado parcialmente por el FONACIT a través del Proyecto G 9 7000 700, otorgado a la Dra. Eva de García. Esta investigación forma parte del Proyecto de Tesis Doctoral "Caracterización morfoanatómica, ultraestructural y bioquímica de los procesos relacionados con la embriogénesis somática en *Musa spp.*".

* Estudiante de Postgrado en Botánica y Profesora del Departamento de Botánica. La Universidad del Zulia (ULA). Facultad de Agronomía. Apdo. 15205. ZU4005. Email: mcramire@cantv.net.

** Profesores. UCV. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental. ***Centro de Microscopía Electrónica (CME), respectivamente. Apdo. 47114. Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela.
Email: egarcia@reacciun.ve / hfinol@electra.ciens.ucv.vede

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un proceso morfogénético que permite obtener altos volúmenes de producción de plantas clonadas, en un período de tiempo corto y con menores costos. No obstante, su empleo para la propagación comercial de banano aún es escaso. Una posible explicación de este fenómeno a nivel mundial está relacionada primero con el desconocimiento que existe sobre la biología del proceso, unido a la no disponibilidad de sistemas eficientes y reproducibles de regeneración (Barranco, 2001).

Por otra parte, el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas no se considera un procedimiento común porque presenta varios inconvenientes entre éstos que pocos callos o complejos embriogénicos produzcan una buena suspensión celular (Schoofs *et al.*, 1999).

Por tal motivo, este trabajo tuvo como objetivo caracterizar ultraestructuralmente callos embriogénicos (CE) y no embriogénicos (CNE) de banano Williams, con el fin de aportar nuevos datos que faciliten el conocimiento del proceso embriogénico en banano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron CE y CNE de banano Williams de flores masculinas inmaduras (1,5-2 cm de largo) cultivadas en medio Escalant *et al.* (1994), durante 9 meses, bajo oscuridad y 26 ± 1 °C. El procesamiento de las muestras para su observación al microscopio electrónico (ME) de transmisión (Philips CM-10) se hizo en el CME-UCV con la técnica de corte fino: a) Fijación en solución Karnovsky (glutaraldehído al 2,5% y formaldehído al 37%) en buffer fosfato Millonig (BFM) 0,2 M (pH 7,4; osmolaridad 320 mOsm) por 5 d, 4 °C; b) Postfijación en OsO₄ (1%) en BFM por 7 d, 4 °C; c) Deshidratación ascendente con etanol al 10, 30, 50, 70, 95 y 100% por 1 h cada uno; d) Infiltración en óxido de propileno (OP) (100%) por 1 h, cuatro veces. Luego en OP y resina (EMbed-812) proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 por 24 h; e) Inclusión en resina pura por 1 h, cuatro veces. La última se dejó a 60 °C por 10 d para que polimerice; f) Corte de muestras (60 a 90 nm) con cuchilla de diamante en el ultramicrotomo; g) Contrastación de los cortes finos en acetato de uranilo (2%) -60 °C por 30 min- y citrato de plomo.

Para el ME de barrido (Hitachi S500), las muestras se procesaron hasta etanol absoluto y después se aplicó el método de desecación en punto crítico (Hitachi HCP-2), y luego se cubrieron con oro (Giko Engineering E-IB-2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las células de CE de banano se observaron algunos componentes de la pared celular (PC) y del protoplasto (PRO) (Figura A,B). De la PC se apreció la pared celular primaria (PCP) y la laminilla media (LM). El PRO -rodeado por PC- incluyó la membrana plasmática (MP) y todo lo que ella encierra. Del citoplasma se encontró: 1) MP ubicada entre PC y el protoplasma. 2) Sistema de endomembranas, que participa en la producción de organelos citoplasmáticos, entre ellos el retículo endoplasmático (RE), membrana vacuolar (MV) y aparato de Golgi (AG).

El RE correspondió al tipo rugoso (RER), el cual tiene unidos muchos ribosomas. El AG constó de varias unidades (dictiosomas), probablemente conectadas entre sí. 3) Ribosomas (R) dispersos en el citoplasma o asociados al RER de cada célula. 4) Mitocondrias observadas como pequeños organelos ovalados en el citoplasma. En su parte interna se evidenciaron crestas mitocondriales (Figura B).

En el CNE se detectaron PCP, LM, MP, citoplasma (RER, MV, R y M) y vacuolas grandes (Figura C,D) y el contenido citoplasmático fue menor y la PC delgada. Las células de CE fueron pequeñas, isodiamétricas (Figura E) con citoplasma denso, vacuola pequeña y pared gruesa, y las de CNE grandes, alargadas y laxas (Figura F). Estos resultados tienen semejanza con otros trabajos (Menéndez y García, 1997; Trujillo y García, 1999; Lerma *et al.*, 2002).

AGRADECIMIENTO

A la Histotecnóloga Soffa Mayora, la Lic. Nuri Díaz y el Lic. Ander De Abrisqueta por su colaboración en la preparación de las muestras y la obtención de las micrografías electrónicas de transmisión y barrido.

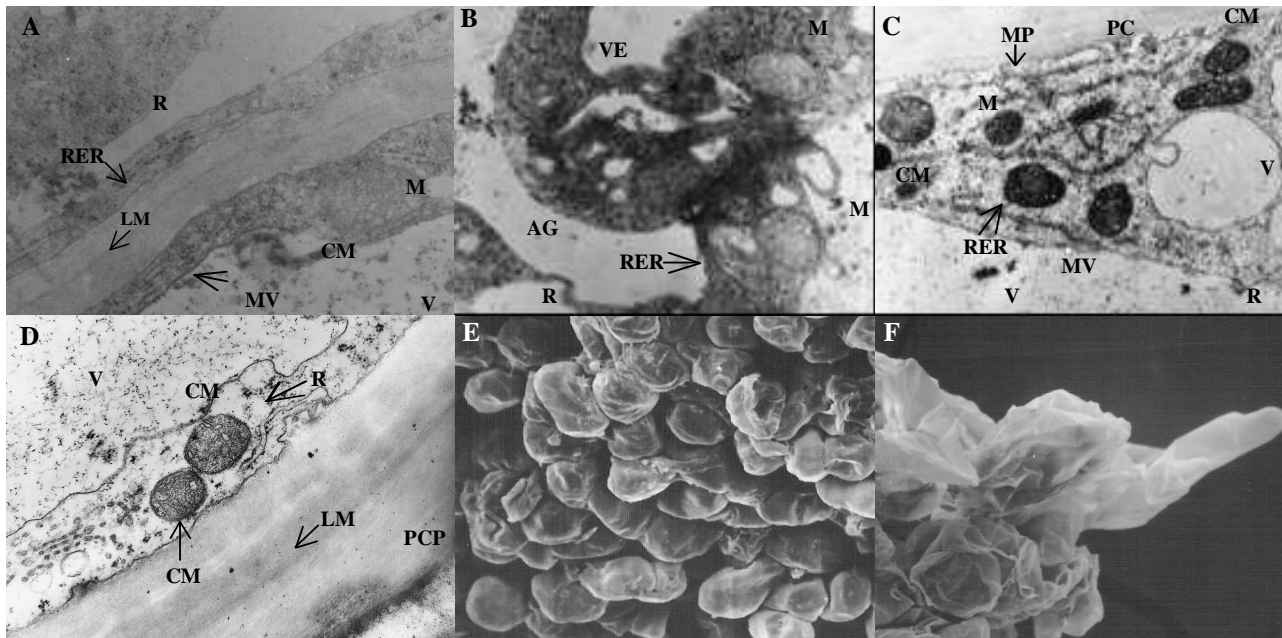


FIGURA. Micrografías electrónicas de transmisión (A-D) y barrido (E, F) de células de callo embriogénico (A, B, E) y no embriogénico (C, D, F) de banano Williams. Componentes observados: Pared celular (PC). PC primaria (PCP). Laminilla media (LM). Membrana plasmática (MP). Mitochondria (M). Cresta mitocondrial (CM). Retículo endoplasmático rugoso (RER). Ribosoma (R). Vacuola (V). Membrana vacuolar (MV). Aparato de Golgi (AG). Vesícula (VE). A. 10 000X. B) 51 000X. C) 39 000X. D) 66 000X. E) 450X. F) 200X.

BIBLIOGRAFÍA

BARRANCO, L. 2001. Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivos líquidos. Resumen de la Tesis Doctoral. Santa Clara, Cuba. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biología de las Plantas. 37 p.

ESCALANT, J., C. TEISSON and F. CÔTE, 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 30:181-186.

LERMA, S., P. ACUÑA, A. RIVEROS y J. SANDOVAL. 2002. Tasa de multiplicación y potencial de regeneración de embriones somáticos de una suspensión celular de banano (*Musa* AAA cv. “Gran enano”). *InfoMusa* 11:38-44.

MENÉNDEZ, A. and E. GARCÍA, 1997. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. *Protoplasma* 199:208-214.

TRUJILLO, I. and E. GARCÍA. 1999. Somatic embryogenesis *in vitro* of *Musa* clones. *FYTON* 64:7-17.

SCHOOFS, H., B. PANIS, H. STROSSE, A. MAYO, J. LÓPEZ, N. ROUX, J. DOLEZEL y R. SWENNEN. 1999. Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *InfoMusa* 8:3-7.

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Hippeastrum* sp.

Teresa Edith Vargas C.*, Maira Oropeza C.* y Eva de García*

RESUMEN

Hippeastrum es un género de la familia Amaryllidaceae cuyas especies son muy apreciadas desde el punto de vista ornamental y medicinal, dada su belleza y producción de alcaloides de utilidad en la industria farmacéutica. Con la finalidad de lograr la propagación y multiplicación *in vitro* de *Hippeastrum* sp., los bulbos empleados como explantes se desinfectaron utilizando un protocolo minucioso debido a la presencia de mucílago y bacterias en el interior de los mismos. Bulbos intactos y secciones de bulbos, fueron cultivados en el medio con las sales MS (1962) suplementado con 0,4 mg l⁻¹ tiamina, 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 30 mg l⁻¹ de sacarosa, solidificado con 8 g l⁻¹ de agar e incubadas bajo condiciones de luz fluorescente continua (50 µmol m⁻² s⁻¹) a temperatura de 23±1 °C. Se probaron los siguientes tratamientos: Bencilaminopurina (BA) sola a 0,5, 1, 2, 3 mg l⁻¹ y combinada con Ácido Naftalenoacético (ANA) 0,1 mg l⁻¹ y un medio sin sustancias de crecimiento. En el caso de secciones de bulbos, 0,5 y 1 mg l⁻¹ de BA y el medio control resultaron ser los mejores tratamientos hacia la formación de brotes, mientras que para los bulbos intactos los tratamientos más adecuados fueron 2 y 3 mg l⁻¹ de BA.

Palabras Clave: Micropropagación; cultivo *in vitro*; *Hippeastrum*.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. E-mail: teoriedu@cantv.net.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

MICROPROPAGATION OF *Hippeastrum* sp.

Teresa Edith Vargas C.*, Maira Oropeza C.* y Eva de García*

SUMMARY

Hippeastrum is a genus of the Amaryllidaceae family, whose species are highly appreciated for their ornamental and medicinal value due to their beauty and production of alkaloids of utility in the pharmaceutical industry. The goal of this work was to propagate *Hippeastrum* plants *in vitro* and massively. For explant disinfection a meticulous protocol was used because of the presence of mucilage and bacteria. Intact and sectioned bulbs were incubated on MS (1962) salts supplemented with thiamine (0,4 mg l⁻¹), sucrose (30 g l⁻¹), solidified with agar (8 g l⁻¹) and incubated under continuous fluorescent light conditions at a temperature of 23 ± 1 °C. Treatments assayed were Benzylaminopurine (BA, 0,5, 1, 2, 3 mg l⁻¹) only, combined with Naphtalenacetic acid (ANA, 0,1 mg l⁻¹) and a control medium without hormonal substances. For sectioned bulbs, BA (0,5, 1 mg l⁻¹) and the control medium proved to be the best treatments that favored shoot formation, while for intact bulbs the best treatments were BA (2, 3 mg l⁻¹).

Key Words: Micropropagation; *in vitro* culture; *Hippeastrum*.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Centro de Botánica Tropical. Instituto de Biología Experimental. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. E-mail: teoriedu@cantv.net.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Hippeastrum* perteneciente a la familia Amaryllidaceae, son ornamentales muy apreciadas que se caracterizan por tener flores grandes de llamativos colores, por lo que tienen un lugar muy importante dentro de la floricultura comercial para la venta como flores de corte o flores de maceta. Además, por el alto contenido de alcaloides algunas especies de este género son usadas en la industria farmacéutica. La propagación convencional de las especies bulbosas se realiza por semillas o por bulbos, sin embargo las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* favorecen el crecimiento de estas especies, debido a que disminuyen el tiempo requerido para el ciclo vegetativo, ya que el bulbo alcanza en menor tiempo el tamaño mínimo para iniciar el ciclo reproductivo (Murashige, 1974; Chen *et al.*, 2005). Este trabajo tiene como objetivo la propagación *in vitro* de plantas de *Hippeastrum* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon como explantes bulbos provenientes de plantaciones cultivadas. Los explantes se lavaron con agua y jabón comercial, se trataron por tres horas con el fungicida VITAVAX (Carboxim 17% y Thiram 17%) y se enjuagaron dos veces con agua destilada. Se colocaron en cloro comercial al 50% + 2 gotas de Tween 20 (30 minutos), se enjuagaron 2 veces con agua destilada. Un grupo de bulbos se seccionó en dos y otro grupo se mantuvo intacto, ambos grupos se colocaron en el antibiótico Cefatoxima 0,1 mg ml⁻¹ (1 hora), sin enjuagar. Los explantes fueron cultivados en el medio con las sales MS (1962) suplementado con 0,4 mg l⁻¹ tiamina, 100 mg l⁻¹ mio-inositol, 30 g l⁻¹ sacarosa y solidificado con 8 g l⁻¹ agar. Se probaron los siguientes tratamientos: Benciladenina (BA) sola a 0,5, 1, 2, 3 mg l⁻¹ y combinada con Ácido Naftalenoacético (ANA) 0,1 mg l⁻¹ y un medio sin sustancias de crecimiento. Se emplearon 20 explantes por tratamiento. Las condiciones de cultivo fueron: luz fluorescente (50 µmol m⁻² s⁻¹) y temperatura de 23± 1 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método empleado para la desinfección de los explantes fue adecuado, observándose 20% de explantes contaminados por bacterias. Muchas especies bulbosas presentan en el interior de sus bulbos, mucílago y

bacterias que dificultan el establecimiento de un cultivo *in vitro* en condiciones asépticas (Hol y Linde, 1992; Chang *et al.*, 2003; Sochacki y Orlikowska, 2004).

A los 45 días de cultivo se observó que el 95% de los bulbos intactos habían desarrollado un promedio de 2 brotes en los medios con 2 y 3 mg l⁻¹ de BA, ver Cuadro (Figura A y B). En el caso de los bulbos seccionados, se apreció 87% de explantes desarrollando un promedio de 4 brotes, en el medio sin sustancias de crecimiento y en los tratamientos con las concentraciones más bajas de citocinina (0,5 y 1 mg l⁻¹ BA) como se muestra en las Figuras C y D y Cuadro.

Seabrook y Cumming (1977), Slabbert *et al.* (1993), trabajando con micropropagación de las Amarillidáceas *Hippeastrum* spp. *Hybrids* y *Crinum macowani* encontraron la mayor producción de brotes en bulbos seccionados cultivados en medios sin citocininas. Cuando se utilizó 0,1 mg l⁻¹ de ANA sólo y combinado con 0,5 mg l⁻¹ de BA se apreció la formación de raíces y no hubo aumento en la formación de brotes en ninguno de los casos.

CUADRO. Efecto de la Benciladenina (BA) en la formación de brotes en bulbos intactos y seccionados de *Hippeastrum* sp. a los 45 días de cultivo.

Tipo de explante	BA(mg l ⁻¹)				
	0	0,5	1	2	3
% de explantes intactos con brotes	10	20	50	95	95
% de explantes seccionados con brotes	80	85	70	30	10
Promedio de brotes por explante intactos	0,1	0,2	0,7	1,9	1,75
Promedio de brotes por explante seccionado	3,5	3,75	3,65	0,65	0,1

En esta investigación se observaron diferencias en las respuestas de ambos explantes con los tratamientos empleados. Los bulbos intactos requirieron de concentraciones más altas de Benciladenina para que se desarrollaran los brotes, mientras que los bulbos seccionados formaron brotes en medios con bajas concentraciones o en ausencia de esta hormona vegetal, así mismo se observó que el promedio de brotes por explante fue mayor en el caso de los bulbos seccionados.



FIGURA. A: Bulbo intacto desarrollando 1 brote; B: Bulbo intacto mostrando brotes adventicios y raíces; C: Bulbos seccionados comenzando a desarrollar brotes; D: Bulbo seccionado formando 3 brotes.

BIBLIOGRAFÍA

CHANG, H. S., D. CHAKRABARTY, E. J. HAHN and K. Y. PAEK. 2003. Micropropagation of Calla Lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* Shoot Tip Proliferation. *In vitro*. 39(2):129-135.

CHEN, J., D. HALL and V. De LUCA. 2005. Effects of the Growth Retardant Paclobutanol on Large-scale Micropropagation of Daylily (*Heemerocallis* spp.). *In vitro*. 41(1):58-63.

HOL, G. M. and P. C. VAN DER LINDE. 1992. Reduction of parent bilbs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31:75-79.

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

MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.

SEABROOK, J. and B. CUMMING. 1977. The *in vitro* propagation of *Amaryllis* (*Hippeastrum* spp. *hybrids*). *In vitro* 13(12):831-836.

SLABBERT, M., M. De BRUYN, D. FERREIRA and J. PRETORIUS. 1993. Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii* *in vitro*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 33:133-141.

SOCHACKI, D. and T. ORLIKOWSKA. 2005. The obtaining of narcissus plants free from potyviruses via adventitious shoot regeneration *in vitro* from infected bulbs. *Scientia Horticulturae.* 103:219-225.

EFFECTO DE LA PLANTA MADRE EN EL ESTABLECIMIENTO *in vitro* DEL GUANÁBANO¹

Gisela del C. Rivero M.* , Maribel del C. Ramírez V.*
y Silvia L. de Sierralta**

RESUMEN

Para determinar la variación en la respuesta al establecimiento *in vitro* de segmentos nodales provenientes de 8 plantas madres fenotípicamente similares de guanábano, *Annona muricata* L., se evaluó el efecto de la planta madre sobre la viabilidad, brotación, contaminación por bacterias y por hongos. Todas las variables resultaron estadísticamente diferentes ($P < 0,01$) para la mayoría de las plantas. Se recomienda hacer estudios estadísticos que permitan disminuir la variación ocasionada por el uso de diferentes plantas donantes.

Palabras Clave: *Annona muricata* L.; planta donante; micropropagación.

1 Trabajo financiado parcialmente por CONDES-LUZ.

* Profesoras. Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía. Dpto. de Botánica y **Química. Laboratorio de Cultivo de Tejidos-IIA. Apdo. 15205. Maracaibo, estado Zulia 4005. Venezuela. E-mail: riverogisela@cantv.net.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

EFFECT OF STOCK PLANT ON THE *in vitro* ESTABLISHMENT OF SOURSOP

Gisela del C. Rivero M.*, Maribel del C. Ramírez V.*
y Silvia L. de Sierralta**

SUMMARY

To determine variability in the response to the *in vitro* establishment of nodal segments collected from eight adult *Annona muricata* L. plants phenotypically similar, the effect of stock plant on viability, shoot formation, bacteria and fungi contamination was evaluated. All variables resulted statistically different ($P < 0,01$) for most of the plants. Statistical studies are recommended in order to decrease variation among plants or treatments.

Key Words: *Annona muricata* L.; plant donor; micropropagation.

1 Trabajo financiado parcialmente por CONDES-LUZ.

* Profesoras. Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía. Dpto. de Botánica y **Química. Laboratorio de Cultivo de Tejidos-IIA. Apdo. 15205. Maracaibo, estado Zulia 4005. Venezuela. E-mail: riverogisela@cantv.net.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El uso de la biotecnología constituye una valiosa herramienta para mejorar la productividad de diversos cultivos, entre ellos el género *Annona*. Rasai *et al.* (1994) han presentado ensayos exitosos en algunas especies de *Annona*, incluyendo *A. muricata*. Sin embargo, cuando se diseñan experimentos de cultivo *in vitro*, se requiere de un número representativo de explantes que permitan cumplir con las exigencias de los análisis estadísticos, lo que conlleva a tomarlos de diferentes plantas madres (Nas *et al.*, 2005) ello podría afectar la respuesta del factor estudiado.

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de plantas madres fenotípicamente similares sobre la viabilidad, contaminación y brotación de segmentos nodales de guanábano al establecerlos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 8 plantas fenotípicamente similares de *A. muricata* de 3 años de edad, establecidas en campo y provenientes de semilla; de éstas se tomaron brotes apicales para cortar el 3° y 4° nudo (Rivero *et al.*, 2001) y desinfectarlos según Ramírez- Villalobos *et al.* (2004).

Los explantes se sembraron en el medio Murashige y Skoog (1962), más 0,5 g l⁻¹ de bencilaminopurina y se colocaron bajo luz (19 µmol m⁻² s⁻¹) a 25 °C. El diseño experimental utilizado fue totalmente al azar, utilizando 5 repeticiones de 5 explantes cada una para un total de 25 explantes por tratamiento o planta donante. Se evaluó porcentaje de viabilidad, en el cual se consideró el número de explantes vivos (PV), contaminación por hongos (PCH) y bacterias (PCB), y brotación (PB) durante 42 días. El análisis estadístico se realizó empleando el programa SAS y la comparación de medias con la prueba de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al final de las observaciones los resultados obtenidos reflejaron diferencias significativas (P<0,01) entre plantas madres para todas las variables estudiadas (ver Cuadro).

El material proveniente de las plantas madres 2 y 3 fue el que presentó

la menor contaminación por hongos y bacterias. En material adulto de *A. cherimola* de campo se ha señalado el problema de contaminación y las limitaciones derivadas de ello (Tazzari *et al.*, 1990). En el caso de la brotación, se obtuvo el máximo valor en la planta 2 (64%) y el mínimo en la planta 1 (16%), no se observó diferencias en el resto. En *A. cherimola* se han obtenido PB con valores del 50% (Rasai *et al.*, 1995). La viabilidad fue diferente en tres de las plantas. Las diferencias observadas entre plantas podrían ser explicadas al considerar la variación genética generada por la propagación sexual y las condiciones fisiológicas y de crecimiento de cada planta madre (Read y Economou, 1987).

BIBLIOGRAFÍA

CUADRO. Porcentajes de contaminación por hongos (PCH) y bacterias (PCB), brotación (PB) y viabilidad (PV) en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *A. muricata* L. provenientes de diferentes plantas madres, a los 42 días de la siembra. Medias con letras distintas difieren significativamente ($P < 0,01$).

Tratamiento	Porcentaje de contaminación por hongos	Porcentaje de contaminación por bacterias	Porcentaje de Brotación	Porcentaje de Viabilidad
Planta 1	56 a	20 abc	16 b	8 b
Planta 2	0 c	0 c	64 a	48 a
Planta 3	4 c	0 c	28 ab	48 a
Planta 4	28 b	12 bc	48 ab	24 ab
Planta 5	4 c	23 abc	36 ab	24 ab
Planta 6	8 bc	16 abc	28 ab	16 ab
Planta 7	4 c	40 ab	28 ab	28 ab
Planta 8	0 c	48 a	40 ab	24 ab

MURASHIGE, T. and F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology plant.* 13:473-479.

NAS, M., K. ESKRIDE and P. READ. 2005. Experimental designs suitable for testing many factors with limited number of explants in tissue culture. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 81:213-220.

RAMÍREZ-VILLALOBOS, S. LEÓN de SIERRALTA, M. MARÍN y A. NAVA. 2004. Manejo de plantas madres para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.). *J. Agric. Univ. P.R.* 88 (1-2):73-89.

RASAI, S., A. GEORGE and A. KANTHARAJAH. 1995. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. *Scientia Hort.* 62:1-14.

READ, P. and A. ECONOMOU. 1987. Stock plant influence on tissue culture success. **In:** *in vitro* problems related to mass propagation. *Acta Horticulturae* 212.

RIVERO, G., M. RAMÍREZ y S. LEÓN de S. 2001. Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 18:258-265.

TAZZARI, L. P. PESTELLI, P. FIORINO and G. PARRI. 1990. Propagation techniques for *Annona cherimola* Mill. *Acta Horticult.* 275:315:321.

CULTIVO DE ANTERAS EN DOS CLONES DE YUCA

Marilú Chirinos*, **Rosalía Velásquez S.***, **Arnaldo Noguera***
Miguel Pérez*, **Jonás Mata*** y **Delia Polanco****

RESUMEN

El cultivo de anteras de yuca, *Manihot esculenta* Crantz, es una estrategia de mejoramiento genético para la producción de plantas haploides, permitiendo la selección de clones mejorados y la detección de genes favorables mediante las técnicas moleculares. No se ha precisado un protocolo que asegure la producción de plantas haploides en el cultivo, para ello se evaluó la respuesta morfogénica de dos clones de yuca: UCV-2726 (dulce) y UCV2375 (amarga), para tal fin se evaluó el tamaño del botón floral (1-1,5mm y 2-2,5mm) que determinará la fase de desarrollo óptimo de la microspora. Se evaluaron dos medios de cultivo: Murashige y Skoog (MS) y Chu *et al.*, (N_6) ambos suplementados con dos concentraciones de auxina. Se estableció un diseño completamente aleatorizado en un arreglo factorial 3^2 , y realizando la prueba de media de Duncan. Se observaron microsporas en tétrada y en fase uninucleada para el tamaño de botón 1-1,5 mm. Durante la inducción de callos se encontraron diferencias para el tamaño del botón, siendo mayor el número de callos formados para el tamaño de 1-1,5 mm en el medio de MS. El ANAVAR no arrojó diferencias significativas entre el tipo de clon y la respuesta al medio de cultivo, sin embargo, hubo diferencias en cuanto al tamaño del botón floral. Se generaron dos grupos de medias indicando que ambas longitudes generan diferentes números de callos. El tejido calloso se diferenció morfogénicamente en raíces, esto pudiera estar asociado con las auxinas aplicadas al medio.

Palabras Clave: *Manihot esculenta*; anteras; haploides.

* Profesores. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía. Instituto de Genética. Centro de Investigación en Biotecnología Agrícola. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y **Cátedra de Raíces y Tubérculos. Dpto. de Agronomía. Apdo 4579. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ANTHER CULTURE IN TWO CASSAVA CLONES

Marilú Chirinos*, **Rosalía Velásquez****, **Arnaldo Noguera*****,
Miguel Pérez, **Jonás Mata**** y **Delia Polanco****

SUMMARY

Cassava anther culture is a strategical tool for breeding programs in order to obtain haploid plants, allowing selection of improved clones and detection of very important genes through molecular markers. A complete protocol for cassava haploid plant production has not been developed, therefore we evaluated morphogenic response in two cassava clones: sweet (UCV-2726) and bitter (UCV-2375), for two different sizes (1-1.5 mm and 2-2,5 mm) of floral buds selected in order to ascertain the optimal developmental phase of the microspore. Murashige and Skoog and Chu *et al.* media were evaluated, supplied with two different auxin concentrations. A factorial 3² completely randomized design and Duncan test were used as statistical methods. For floral bud size of 1-1.5 mm, tetrad and uninucleated microspores were observed. During callus induction, differences were found for bud size with the highest number of calluses formed for 1-1.5 mm in MS medium. The ANAVAR did not show significant differences between clone types and culture media. There were two different mean groups for callus number. Callus tissue differentiated morphogenically into roots; this might be associated with auxins applied to the medium.

Key Words: *Manihot esculenta*; anthers; haploids.

- * Profesores. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía. Instituto de Genética. Centro de Investigación en Biotecnología Agrícola. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y **Cátedra de Raíces y Tubérculos. Dpto. de Agronomía. Apdo 4579. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El consumo de yuca, *Manihot esculenta* Crantz, se ha incrementado en los últimos años dado su aporte en la dieta humana y animal, a la mayor eficiencia en el aporte de carbohidratos en relación con los cereales, y su alto porcentaje de fibra (Brekelbaum, 1991).

Es una especie altamente heterocigota y alopoliploide ($2n = 4x = 36$), esto dificulta la obtención de líneas homocigotas (Luciani, 1985). Con la producción *in vitro* de haploides y dihaploides, a partir de anteras en yuca, se podrían obtener líneas homocigotas deseables y necesarias para la producción de híbridos con expresión de alelos recesivos que no se detectan por la heterocigosidad (Roca, 1991).

La formación *in vitro* de plantas haploides ocurre a partir de polen inmaduro, cuando el polen está maduro no se inicia al desarrollo embriogénico o se desarrollan plantas diploides (Reddy, 1985; Guha-Mukherjee, 1999). Los estudios en microesporogénesis son necesarios porque permiten observar las diferentes secuencias de desarrollo del polen, tipificando el grado de maduración del grano de polen. La fase uninucleada es la que mejor responde a las condiciones *in vitro* (Villalobos, 1991).

Woodward (2001) regenera embriones somáticos a partir de inflorescencias de yuca en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con $2 \mu\text{M}$ CuSO_4 y 12 mg l^{-1} de picloram, previo pretratamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 días. Contrariamente Liu, (1978) observa la no formación de callos en anteras de yuca cuando los botones son pretratados por más de 48 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por otro lado, Ascanio (1988) trabajando con anteras de café señala que si éstas son sometidas a bajas temperaturas, se incrementa la respuesta callogénica o embriogénica, debido a la formación de dos núcleos iguales durante la primera mitosis. Este trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta *in vitro* en el cultivo de anteras de dos clones de yuca pertenecientes al Banco de Germoplasma del Campo Experimental de la Facultad de Agronomía, UCV, probándose dos tamaños de botón floral, dos medios de cultivo y la respuesta morfogénica de los callos formados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la Facultad de Agronomía, UCV. En el material vegetal se utilizaron flores masculinas de los clones UCV 2726 (Tipo Dulce) y UCV 2375 (Tipo Amarga) ubicados en el Campo Experimental, cortando la zona apical de la planta y llevadas al laboratorio en cava con hielo. Se seleccionaron dos tamaños de botones florales: 1–1,5 mm y 2–2,5 mm con el objeto de determinar la fase de desarrollo óptimo de la microspora. Se colocaron en nevera a 5°C por 7 días para producir un choque de frío.

Se evaluaron 2 medios de cultivo diferentes: MS (1962) suplementado con 50 g l⁻¹ azúcar, 2 mg l⁻¹ ácido naftalen acético (ANA), 0,5 mg l⁻¹ kinetina (Kin), y 50mg l⁻¹ cystina como antioxidante y el medio N6 compuesto por las sales de Chu *et al.* (1975), 50 g l⁻¹ azúcar, 4 mg l⁻¹ ANA, 1mg l⁻¹ Kin, 50 mg l⁻¹ cystina.

Para las observaciones al microscopio del estado de desarrollo de la microspora se usó carmín Acético al 1%.

En el ensayo se utilizó un diseño completamente al azar en un arreglo factorial de 3² con 4 repeticiones por tratamiento, tomando como unidad experimental una cápsula de Petri con 7-8 anteras. Las variables evaluadas fueron porcentaje de formación de callos, apariencia del callo y respuesta morfogénica. Los datos se analizaron por el programa SAS 6,1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de la microspora

El tamaño del botón floral se relacionó con las etapas de desarrollo de la microspora (Figura 1), se observaron microsporas en tétradas, uninucleadas en el tamaño 1–1,5 mm mientras que en los botones 2–2,5 mm se observaron granos de polen maduros más las fases anteriores. Estos resultados coinciden con los presentados por Cañas y Roca (1982) quienes determinaron por estudios citológicos el estado de desarrollo de las microsporas con respecto a la longitud del sépalo en botones florales de yuca, estableciendo el tamaño óptimo el comprendido entre 1,5–2,2 mm,

correspondiente a los estados de tétradas tardías y microsporas uninucleadas tempranas. Woodward (2001) señala que el rango de tamaño en botones masculinos de yuca oscila entre 0,3–2,5 mm existiendo correlación entre el tamaño del botón y el estado uninucleado de la microspora.

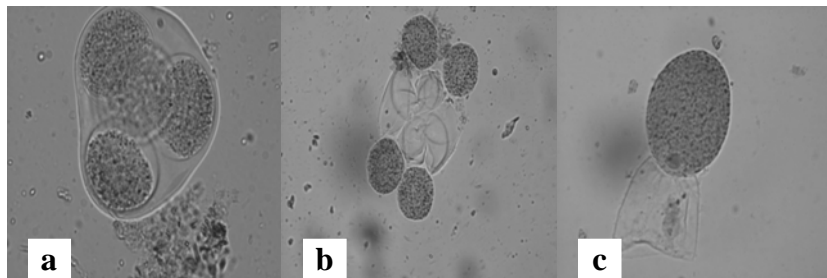


FIGURA 1. Desarrollo de la microspora. **a)** Tétrada en fase temprana. **b)** Tétrada Fase tardía. **c)** Grano de polen uninucleado.

Inducción de callos

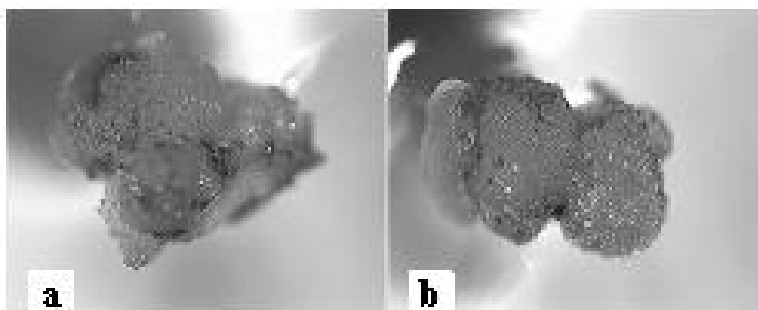
Debido al alto porcentaje de contaminación obtenido en el medio N6, el factorial se redujo a 2^2 . No se observó diferencias significativas entre el tipo de yuca y la respuesta al medio de cultivo (Cuadro 1), sin embargo, hubo diferencias para la variable tamaño del botón floral.

A partir de los 9 días, ocurrió engrosamiento de las anteras y cambio de coloración en la superficie, a los 15 días se observaron formaciones hiperhídricas y apertura de las anteras y a los 25 días la coloración de los callos era de beige a marrón claro en ambos clones (Figura 2). La proporción de callos varió significativamente en cuanto al tamaño del botón, encontrándose mayor número de callos/antera en el rango 1-1,5 mm (Cuadro 1), de apariencia friable, y con un gran número de células redondeadas y en constante división al realizar las observaciones microscópicas, se señala además células en fase binucleada. Según Ascanio (1988) trabajando con microsporas *in vitro* de café determinó que en la primera mitosis, se originó dos núcleos iguales, cada uno de los cuales se dividirá nuevamente y continuará el proceso hasta formar un callo o

CUADRO 1. Análisis de varianza (ANAVAR) para la variable tamaño del botón floral.

F de V	gl	SC	CM	FC	P > F
Clon de yuca	3	88,42	29,47	3,09	0,0676
Error	12	114,34	9,53		
Total	15	202,77			

$\alpha = 0,05$

**FIGURA 2.** Callos formados en anteras de ambos clones. **a)** Clon 2 375 tipo amargo. **b)** Clon 2726 tipo dulce.

un embrión somático.

El tipo de clon dulce (UCV 2776) y amarga (UCV 2375) no influyó sobre la formación de callos, se presume que la diferenciación *in vitro* en las anteras del tipo amarga no está afectada por los glucósidos cianogénicos o que estos compuestos están presentes en muy baja cantidad o están ausentes. Tampoco se observó diferencias significativas en tipo de yuca y longitud del botón floral, lo cual indica que estos dos factores son independientes a la formación de callos (Cuadro 2).

Se generaron dos grupos de medias, A: 6,52mm y B: 2,5mm, demostrando que ambas longitudes generan un número diferente de callos.

CUADRO 2. Análisis de varianza (ANAVAR) para las variables tipo de yuca y longitud botón floral.

F de V	gl	SC	CM	FC	Pr > F
Longitud	1	64,641	64,64	6,78	0,0230 *
Tipo	1	23,765	23,76	2,49	0,1403 N.S.
Long * tipo	1	0,0156	0,015	0,0	0,9684 N.S.

$\alpha = 0,05$ CV= 68,44

Respuesta morfogénica de los callos

En callos provenientes de botones de 1–1,5 mm se formaron raíces con longitud aproximada de 10 cm (Figura 3).

Fariñas (1992) demostró que las respuestas morfogénicas en callos son producto de los tratamientos utilizados, los cuales dependen de factores internos y externos del explante o genotipo.



FIGURA 3. Diferenciación morfogénica en los callos de anteras de yuca tipo dulce.

CONCLUSIONES

- El tamaño y estado óptimo del botón floral para la formación de callos fue de 1–1,5 mm, tamaño en el cual el mayor número de granos de polen estaba en estado uninucleado. Las anteras respondieron satisfactoriamente al medio de cultivo constituido con las sales MS para la formación de callos y la diferenciación morfogénica. El tipo de yuca no afectó la respuesta de las anteras al medio de cultivo.
- El alto porcentaje de contaminación durante el ensayo, pudo estar asociado a las condiciones ambientales a la cual estuvieron sometidas las plantas en campo, coincidiendo con el período lluvioso.
- Es necesario aplicar pruebas citogenéticas que determinen el número de cromosomas en las células del callo.

BIBLIOGRAFÍA

ASCANIO, C. 1988. Inducción de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras de cafeto (*Coffea arabica* L). Trabajo de Ascenso. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 89 p.

BREKELBAUM, T. 1991. Secado natural de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en la costa norte de Colombia. IICA Colombia. 20 p.

CAÑAS, B. y W. ROCA. 1982. Cultivo de anteras en yuca (*M. esculenta* Crantz). Revista de la Universidad Industrial de Santander, Colombia 12(1):5-16.

CHU, C., C. C. WANG, C. S. SUNG, K. C. YIN, C. CHUC and F. Y. BI. 1975. Establishment of an efficient medium anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. Scientia Sirica. 18(5):659-668.

FARIÑAS, Y. 1992. Producción de plantas haploides mediante el cultivo *in vitro* de polen de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Doctoral. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de

Agronomía. 188 p.

GUHA- MUKHERJEE, S. 1999. The Discovery of haploid production by anther culture. *in vitro* Cell. 35:357-360.

LIU, M. and W. CHEN. 1978. Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers. *Can. J. Bot.* 56(10):1 287-1 290.

LUCIANI, J. 1985. Avance en la selección por contenido de materia seca en plantas de yuca de libre polinización. *Revista de la Facultad de Agronomía, UCV.* Alcance 33:111-123.

MURASHIG, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and broassays with tabacco tissue cultures. *Phyosiol. Plant.* 15:474-497.

REDDY, V. S. LEELAVATHI and S. SEN. 1985. Influence of genotype and culture medium on microspora callus induction and green plant regeration in anthers of *Oryza sativa* L. *Physiology Plant.* 63:309-314.

ROCA, W. y L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura. *Fundamentos y aplicaciones.* Cali, Colombia, CIAT. 970 p.

VILLALOBOS, V. 1990. Fundamentos teórico – práctico del cultivo de tejidos vegetales. Editorial de la Organización Mundial para la Agricultura y Alimentación (FAO). 112 p.

WOODWARD, B. and J. POUNTI–CAERLAS. 2001. Somatic embryogenesis from floral tissue of Cassava (*M. esculenta* Crantz). *Euphytica.* 120:1-6.

DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LÍNEAS DE MAÍZ USANDO MARCADORES SSR

Hilda Fernández* Félix San Vicente*
Carlos Marín ** y Darío Torrealba**

RESUMEN

Se utilizaron 8 loci microsatélites (bnlg1484, bnlg2323, bnlg1601, bnlg1194, dupssr34, mmc0501, umc1545 y umc1594) para analizar y estimar el grado de relación genética entre 21 líneas introducidas del CIMMYT, con el objeto de comprobar su utilidad para el programa de mejoramiento genético de maíz del INIA. El análisis de distancia genética reveló que la información obtenida a partir de los 8 loci microsatélites permitió diferenciar las líneas analizadas. El algoritmo de agrupamiento de los materiales estudiados se basó en el método Ward, y el dendrograma muestra la formación de 5 grupos, los cuales en su mayoría coinciden con la información genealógica de las líneas estudiadas. Estos resultados junto con los caracteres agronómicos son de gran utilidad para planificar los cruzamientos del programa de mejoramiento. La secuencia de los loci se obtuvo de la base de datos de maíz (Maize Data Bank: <http://www.maizegdb.org>). El número total de bandas producidas por los 8 iniciadores fue 148, de las cuales 109 fueron polimórficas. El contenido de información polimórfica (PIC) de los marcadores fue alto para todos los loci, con un promedio de 0,91, lo que ratifica la observación general que a medida que aumenta el número de bandas obtenidas por iniciador se incrementan los valores de PIC.

Palabras Clave: Maíz; *Zea mays* L.; SSR; grupos heteróticos.

* Investigadores y **Técnicos Asociados a la Investigación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apdo. 4653. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.
E-mail: hfernandez@inia.gov.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

DETERMINATION OF THE GENETIC RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC MAIZE LINES USING SSR MARKERS

Hilda Fernández* Félix San Vicente*
Carlos Marín ** y Darío Torrealba**

SUMMARY

Eight microsatellite loci (bnlg1484, bnlg2323, bnlg1601, bnlg1194, dupssr34, mmc0501, umc1545 y umc1594) were used to analyze and to estimate the genetic relationship among 21 maize inbred lines introduced from CIMMYT in order to determine their usefulness for INIA's maize breeding program. Genetic distance analysis revealed that the information obtained from the 8 microsatellite loci allowed the differentiation of the lines under study. The grouping algorithm was based on Ward method, and the dendrogram resulted in 5 groups, which in most cases coincide with the line pedigree information. These results along with agronomic trait information is of great utility for planning crosses in the breeding program. The loci sequence was obtained from the maize data base (Maize Data Bank: <http://www.maizegdb.org>). The total number of bands produced was 148, with 109 being polymorphic. The content of polymorphic information (PIC) for the markers was high for all loci, with an average of 0,91, agreeing with the general observation that increasing the number of bands per initiator also increases the PIC values.

Key Words: Maize; *Zea mays* L.; SSR; heterotic groups.

* Investigadores y **Técnicos Asociados a la Investigación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apdo. 4653. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.
E-mail: hfernandez@inia.gov.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela la producción de maíz, *Zea mays* L., es la de mayor importancia dentro del grupo de cereales, tanto en función de volumen como de valor de la producción. La misma se destina en un 80% a la fabricación de harina precocida y el resto se utiliza para el consumo fresco y para el procesamiento de maíz pilado. El 95% del área destinada al cultivo de maíz es sembrada con híbridos, concentrándose la producción en los estados Portuguesa, Guárico y Barinas (Cabrera y García, 2002).

En los programas destinados a obtener híbridos de maíz, el conocimiento de las relaciones genéticas entre las líneas es de gran utilidad para la planificación de los cruzamientos que darán origen a los híbridos (Betrán *et al.*, 2003; Nestares *et al.*, 1999) y para la asignación de líneas a grupos heteróticos (Pinto *et al.*, 2003). Por estas y otras razones los fitomejoradores tienen un gran interés en la caracterización de la diversidad genética entre y dentro de los grupos heteróticos existentes, así como también las relaciones entre las líneas actuales e históricamente importantes. Para estimar la diversidad genética en plantas los marcadores morfológicos y de rendimiento han sido tradicionalmente utilizados, sin embargo los mismos no proporcionan resultados precisos sobre el genotipo de los individuos (Stuber *et al.*, 1997). La selección asistida por marcadores moleculares promete una ganancia génica más rápida que las actuales prácticas de mejoramiento (Lipkin *et al.*, 1998).

El objetivo de este estudio fue analizar y estimar el grado de relación genética entre 21 líneas introducidas del CIMMYT, a fin de comprobar su utilidad en el programa de mejoramiento genético de maíz del INIA.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material de estudio lo constituyeron 21 líneas provenientes del CIMMYT. El aislamiento de ADN genómico se efectuó a partir de 0,250 g de hojas frescas de plántulas de ocho días de germinadas, siguiendo el protocolo de extracción de ADN descrito por Doyle y Doyle (1987) adicionando durante la maceración con el nitrógeno líquido, polivinil – pyrrolidina (PVP 40) y bisulfito sódico hasta una concentración final de 1% y 0,5 mM, respectivamente, para prevenir la oxidación.

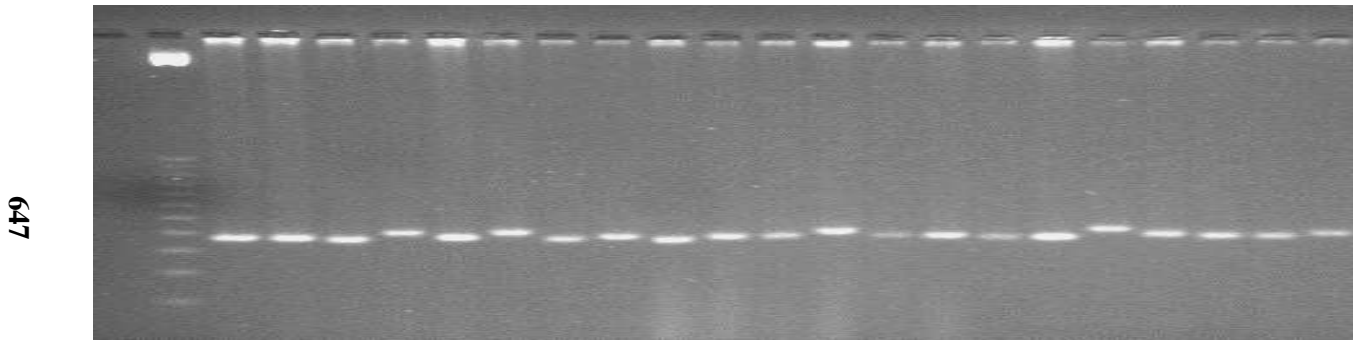
Los iniciadores utilizados (bnlg1484, bnlg2323, bnlg1601, bnlg1194, dupssr34, mmc0501, umc1545 y umc1594) fueron sintetizados de acuerdo a las secuencias publicadas en la base de maíz (Maize Data Bank: <http://www.maizegdb.org>). Las amplificaciones de los mismos fueron efectuadas en un volumen final de 15 μ l, con la mezcla de reacción compuesta por 50 ng de ADN, 2,5 mM de $MgCl_2$, buffer Taq 10X, 1 μ M de iniciador y 5 U de Taq polimerasa. Los ciclos PCR se efectuaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-200, y consistieron en una fase inicial de desnaturalización de 94 °C, seguida por 29 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 56 °C, 1 min a 72 °C y una fase final de extensión de 7 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa MICROPOR (PROMEGA) al 3% Figura 1, preparados con TBE 1X y bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 μ g/ml⁻¹. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal maxigel usando solución tampón TBE 0,5X a 100V durante 2,5 h aproximadamente. Los geles fueron visualizados y digitalizados con el equipo Chemi Doc (Bio-Rad) y analizados con el software Quantity One® versión 4,2 determinándose el tamaño de cada banda presente en pares de bases, usando el marcador 25 pb PROMEGA como referencia. El algoritmo de agrupamiento de los materiales estudiados se basó en el método Ward, el cual consiste en definir la máxima varianza entre los grupos, y la mínima dentro de ellos (Cuadras, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 8 loci probados en este estudio amplificaron un total de 148 bandas de las cuales 109 fueron polimórficas. El contenido de información polimórfica (PIC) de los marcadores fue alto para todos los loci, con un promedio de 0,91, lo que ratifica la observación general encontrada en la literatura que a medida que aumenta el número de bandas obtenidas por iniciador se incrementan los valores de PIC.

El análisis de distancia genética reveló que la información generada a partir de los 8 microsatélites fue suficiente para distinguir las líneas analizadas, las mismas en su mayoría se agruparon coincidiendo con la información genealógica (ver Cuadro). El dendrograma (Figura 2) muestra la formación de 5 grupos.

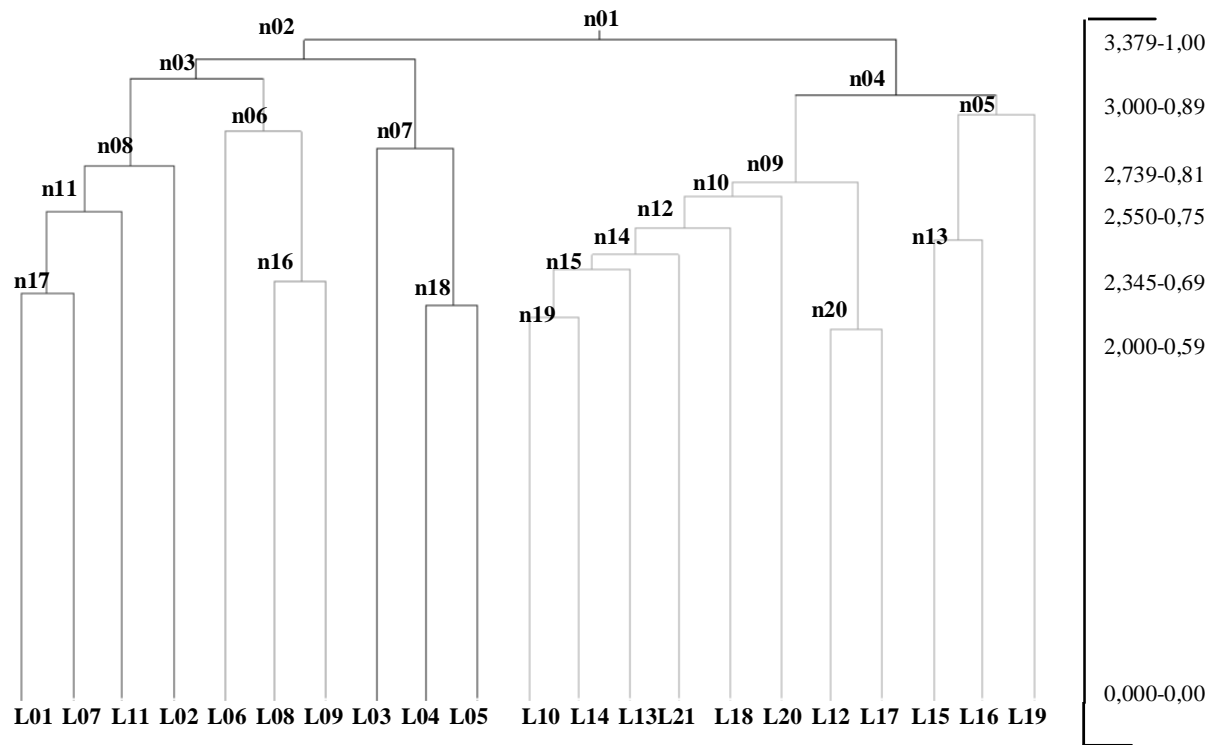


647

FIGURA 1. Perfil SSR de las 21 líneas con el iniciador umc1194 en un gel de agarosa MICROPOR al 3%.

CUADRO. Código de las líneas, genealogía, textura del grano y grupo de ubicación en el dendrograma.

Código Línea	Secuencia en el Laboratorio	Genealogía	Textura Grano	Grupo de Ubicación en el Dendrograma
L1	L01	Tuxpeño-1	dentado	1
L5	L02	Tuxpeño-1	crystalino	1
L21	L07	Tuxpeño 1	crystalino	1
L22	L11	Mezcla Tropical Blanca	dentado	1
L18	L06	Tuxpeño 1	dentado	2
L7	L08	La Posta	dentado	2
L8	L09	La Posta	crystalino	2
L16	L03	Tuxpeño Caribe	crystalino	3
L23	L04	Tuxpeño 1	dentado	3
L12	L05	La Posta	dentado	3
L19	L10	Blanco Tropical Precoz	dentado	4
L25	L12	Tuxpeño-1	dentado	4
L28	L13	Blanco Tropical Tardío	crystalino	4
L33	L14	Tuxpeño-1	dentado	4
L39	L17	Blanco Subtropical	crystalino	4
L41	L18	Tuxpeño-1	crystalino	4
L35	L20	Tuxpeño-1	dentado	4
L38	L21	Sintético resistente taladradores	crystalino	4
L36	L15	Tuxpeño-1	dentado	5
L37	L16	Tuxpeño 1	dentado	5
L34	L19	Tuxpeño 1	crystalino	5



n: Nodos. du: distancia ultramétrica absoluta. du %: distancia ultramétrica relativa.

FIGURA 2. Dendrograma obtenido con el método Ward para las 21 líneas a partir de los 8 SSR polimórficos.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos corroboran a los marcadores microsatélites como una herramienta de excelente complemento a los marcadores morfológicos, utilizados normalmente para discriminar genotipos y para establecer las combinaciones con mayor potencial heterótico en la producción de híbridos de maíz.

BIBLIOGRAFÍA

BETRÁN, F. J., J. M RIBAUT, D. BECK and D. GONZÁLEZ de LEÓN. 2003. Genetic diversity, specific combining ability and heterosis in tropical maize under stress and non stress environments. *Crop Science* 43:797-806.

CABRERA, S. y P. GARCÍA. 2002. El cultivo de maíz en Venezuela. **In:** S.Cabrera (ed). Memorias del IX curso sobre producción de maíz. INIA - ASOPORTUGUESA Acarigua, Portuguesa. pp. 444-464.

CUADRAS, C. 1991. Métodos de Análisis Multivariante. Promociones y publicaciones Universitarias.SA (PPU). España 641 p.

DOYLE, J. J. and J. J. DOYLE. 1987. Isolation of plant DNA from plant Tissue. *Focus* 12:1325

LIPKIN E., E. EZRA., O. MOSIGM, A. SHALOM, H. KHATHIB, E. HEFETZ, H. H. CHE, M. SOLLER. and A. A. FRIEDMAN. 1998. www.nalusda.gov.ttic/tektran/data/000008/21/0000082126

NESTARES, G., E. FRUTOS and G. EYHERABIDE. 1999. Combining ability evaluation in orange flint lines of maize. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34:1 399-1 406.

PINTO, R. de M. C., C. L. de SOUZA Jr., L. A. CARLINI – GARCIA, A. A. F. GARCIA and A. PEREIRA de SOUZA, 2003 Comparison between molecular markers and diallel crosses in the assignment of maize lines to heterotic groups- *Maydica* 48:63-73.

STUBER C. W., M. D. EDWARDS and J. F. WENDEL. 1987. Molecular Markers - facilitates Investigations of Quantity Trait loci in maize. II. Factors Influencing Yield and its Component Trait. *Crop Sci.* 27:639648. 1997).

MICROPROPAGACIÓN DE *Lepidium virginicum* L. A PARTIR DE MICROESQUEJES

Giampapa Brucato*, María Graziella**,
Iselen Esther Trujillo Díaz* y Maira Oropeza C.**

RESUMEN

Lepidium virginicum L., es una planta usada popularmente debido a sus múltiples propiedades farmacológicas, medicinales y por presentar acción contra ciertos parásitos. La micropropagación de *L. virginicum* L., se estableció a partir del cultivo de microesquejes de plantas de 3 meses de edad mantenidas en condiciones de vivero. Los microesquejes fueron cultivados en medios Murashige y Skoog MS suplementados con: Medio A: 1 mg l⁻¹ BA, Medio B: 1 mg l⁻¹ BA+ 1 mg l⁻¹ ANA, Medio C: 2 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ ANA y un medio control sin hormonas. Todos los medios utilizados permitieron la iniciación, multiplicación y enraizamiento de los explantes para la micropropagación de esta especie. A los 30 días de haberse iniciado el cultivo de microesquejes se obtuvo un promedio de 1,87 brotes/explantes. Las vitroplantas presentaron raíces con una longitud promedio de 2,4-3,2 pulgadas, las mismas se presentaron a partir de los 15 días de iniciado el cultivo. En los explantes cultivados en los medios suplementados con hormonas se observa la proliferación de callo.

Palabras clave: *Lepidium* sp.; cultivo “*in vitro*”; microesquejes.

* Profesor. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Centro de Estudios de Agroecología Tropical. Apdo. 47925. Caracas 1010. Venezuela.
E-mail: jam1234@telcel.net.ve

** Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Centro de Botánica Tropical. Apdo. 47114. Caracas 1041. Venezuela.
E-mail: mariagraziellabrucato@yahoo.com / moropeza@ciens.ucv.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

MICROPROPAGATION OF *Lepidium virginicum* L. FROM MICROCUTTINGS

Giampapa Brucato*, María Graziella**,
Iselen Esther Trujillo Díaz* y Maira Oropeza C.**

SUMMARY

Lepidium virginicum L., plants are frequently used because they have numerous pharmacological and medicinal properties and they act against parasites. To establish micropropagation of *L. virginicum* L., 3 month-old-plants from greenhouse were used as microcutting sources. These microcuttings were cultured on MS (1962) medium supplemented with: A: 1 mg l⁻¹ BA, B: 1 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ ANA, C: 2 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ ANA. A control medium without plant hormones was also used. Initiation, multiplication and rooting of explants were observed on these media. After 30 days the average number of shoots per explant was 1,87. The average length of plantlets after 15 days was 2,4-3,2 inches. The explants cultured on media supplemented with hormones showed callus proliferation.

Key Words: *Lepidium* sp.; *in vitro* culture; microcuttings.

* Profesor. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Centro de Estudios de Agroecología Tropical. Apdo. 47925. Caracas 1010. Venezuela.
E-mail: jam1234@telcel.net.ve

** Profesores. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Centro de Botánica Tropical. Apdo. 47114. Caracas 1041. Venezuela.
E-mail: mariagraziellabrucato@yahoo.com / moropeza@ciens.ucv.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Lepidium virginicum L., es una planta que pertenece a la familia: Brassicaceae, anteriormente denominada Cruciferae. Grainge y Ahmed (1988); Calzada *et al.*, (2003) señalan que *L. virginicum* tiene actividad contra ciertos parásitos. Kozel (1991); Lindorf (2001); Lampe y Peterson (2002) establecen que la planta es utilizada para combatir múltiples enfermedades. Debido a las propiedades que presenta esta planta, se evidencia la importancia de establecer un sistema eficiente de propagación vegetativa para esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los microresquejes de *L. virginicum* L., se obtuvieron a partir de plantas de tres meses de edad mantenidas en condiciones de vivero. Estas plantas fueron asperjadas dos veces por semana durante dos semanas con un fungicida de uso comercial marca Horticol® (10 mg l⁻¹). El medio de cultivo que se utilizó fue el de Murashige y Skoog 1962 (MS), enriquecido con vitaminas: tiamina (5 mg l⁻¹), mio-inositol (100 mg l⁻¹), sacarosa (30 g l⁻¹), suplementado con: Medio A: 1 mg l⁻¹ BA, Medio B: 1 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ ANA, Medio C: 2 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ ANA. El agente gelificante utilizado fue agar (8 g l⁻¹), pH 5.8. Treinta explantes fueron incubados en el cuarto de crecimiento a 25 ± 1 °C bajo luz blanca fluorescente continua. Los explantes fueron sub-cultivados a medio fresco cada 21 días. La eficiencia del sistema de regeneración "in vitro" establecido fue medida por el índice de formación de brotes (Trujillo, 1994); los cálculos se efectuaron a los 30 y 60 días de haberse iniciado el cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los explantes cultivados en los diversos medios de cultivo desarrollaron plantas (Figura 1). Luego de haber transcurrido quince días del cultivo las vitroplantas tenían una longitud promedio de 5 cm. Debe señalarse que un balance hormonal entre auxina y citoquinina en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de yemas. El Cuadro muestra los resultados del índice de formación de brotes para cada uno de los diferentes tratamientos aplicados. En este Cuadro se observa que los valores de los índices de formación de brotes para el segundo sub-cultivo, son menores que los correspondientes al primer período de sub-cultivo.

Esto pudo ser debido a que algunos explantes sufrieron un proceso de



FIGURA 1. Vitroplanta de *Lepidium virginicum* obtenida a los 30 días de cultivo.

clorosis y perdieron su capacidad de respuesta. Orellana (1998) señaló que el balance auxina/citoquininas es determinante para el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación.

Los resultados muestran que en el medio de cultivo control y en el medio

CUADRO. Influencia de los medios de cultivo en el N° de brotes/explante formados a los 30 días (1er sub-cultivo) y a los 60 días (2do sub-cultivo).

Tratamientos	Índice de formación de brotes	
	1er sub-cultivo	2do sub-cultivo
Control(Sin hormonas)	1,8	1,73
A (1 mg l ⁻¹ BA)	1,87	1,80
B (1 mg l ⁻¹ BA + 1 mg l ⁻¹ ANA)	1,70	1,6
C(2 mg l ⁻¹ BA + 1 mg l ⁻¹ ANA)	1,6	1,53

de cultivo con 1 mg l^{-1} de BA se origina la mayor proliferación de brotes, mientras que la adición de una auxina junto con esta citoquinina disminuye la formación de los mismos.

Para los 30 explantes cultivados no fue necesaria la utilización de medios para la inducción de raíces, debido a que transcurridos treinta días del cultivo, se formaron raíces en todos los tratamientos. El tiempo de formación de raíces para cada medio de cultivo fue el siguiente: A, 20 días; B, 23 días; C, 30 días y para el control fue de 15 días. Esta variación en los tiempos de aparición de las raíces puede ser debida a la concentración endógena de auxina presente en las vitroplantas. Además, durante el proceso de micropropagación se observó que existe un alto porcentaje de formación de callo en los medios A, B, y C. Así mismo, se observó la formación de raíces a partir de estos callos a los 33 días de cultivo (Figura 2).



FIGURA 2. Callo organogénico de *Lepidium virginicum*.

BIBLIOGRAFÍA

CALZADA, F., E. BARBOSA and R. CEDILLO-RIVERA. 2003. Antiamoebic activity of Benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research*. 17:618–619.

GRAINGE, M. and S. AHMED 1988. *Handbook of plants with pest*

control properties. New York, John Wiley Sons. 470 p.

KOZEL, C. 1991. Guía de medicina natural. Editorial de la misión “la verdad presente”. Décima octava edición. Colombia. 998 p.

LAMPE, J. and S. PETERSON. 2002. Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *Journal of Nutrition*. 132:2 991-2 994.

LINDORF, H. 2001. Un botánico francés en la Venezuela del siglo VIII. *Acta Botánica Venezuelica*, 24:203-214.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 13:473-479.

ORELLANA, P. 1998. Propagación vía organogénesis **In:** Pérez Ponce (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.

TRUJILLO, I. 1994. Aplicación de técnicas biotecnológicas en el mejoramiento genético del género *Musa*. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD FOSFATASA ÁCIDA A PARTIR DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS Y NO EMBRIOGÉNICOS DE CAÑA DE AZÚCAR

Ana Karina Marcano*, Elizabeth Valdivieso** y Maira Oropeza C.**

RESUMEN

Uno de los sistemas de propagación *in vitro* más utilizado en el cultivo de la caña de azúcar, *Saccharum* sp., es la embriogénesis somática. Durante este proceso ocurren cambios en la expresión de las proteínas que pueden ser determinados mediante el análisis de patrones isoenzimáticos, permitiendo estos la evaluación temprana de los cultivos embriogénicos antes de que los cambios morfogénéticos se hagan evidentes. En el trabajo se estudió la presencia de la actividad fosfatasa ácida (ACP) a partir de callos embriogénicos (E) y no embriogénicos (NE) de caña de azúcar. Con el fin de detectar esta actividad se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas, incubándose luego el gel en presencia de los sustratos a-naftil fosfato y b-naftil fosfato a pH ácido. Paralelamente, se determinó la misma actividad en ensayos enzimáticos a punto final, con ligeras modificaciones. Los perfiles electroforéticos mostraron una única banda en ambos extractos, no observándose diferencias significativas en la intensidad de las mismas. No obstante, el ensayo enzimático reveló una mayor actividad fosfatasa ácida (1,5 veces) en los extractos de callos E que en los NE. Estos resultados preliminares sugieren que esta actividad podría utilizarse como marcadora de los procesos de diferenciación que ocurren durante el cultivo *in vitro*.

Palabras Clave: Caña de Azúcar; *Saccharum* sp.; embriogénesis somática; fosfatasa ácida.

* Estudiante de Postgrado en Botánica y **Profesores, respectivamente. UCV. Instituto de Biología Experimental. E-mail: anak_marcano@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

DETERMINATION OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY FROM EMBRYOGENIC AND NON EMBRYOGENIC SUGARCANE (*Saccharum* sp.) CALLUSES

Ana Karina Marciano*, Elizabeth Valdivieso** y Maira Oropeza C.**

SUMMARY

Somatic embryogenesis is one of the *in vitro* propagation systems used more extensively for sugarcane *Saccharum* sp., culture. During this process changes in the protein expression patterns are observed and they can be determined using isoenzymatic analysis. This approach allows early evaluation of the embryogenic potential before the morphogenetic changes become evident. In this work, the acid phosphatase activity (PAC) from embryogenic (E) and non embryogenic (NE) calluses of sugarcane was studied. Gel electrophoresis was performed using polyacrylamide 10% gels under native conditions, followed by incubation with α -naftil phosphate and β -naftil phosphate solutions at acid pH. The same activity was determined on enzymatic assays to end point according to Gottlieb and Dwyer (1981), with some modifications. Electrophoretic profiles showed just one band of the same intensity in each extract. Nevertheless, enzymatic assays revealed a higher acid phosphatase activity (1,5 times) in E callus extracts than in the NE. These preliminary results suggest that acid phosphatase activity could be used as a marker for differentiation processes during *in vitro* culture.

Key Words: Sugarcane; *Saccharum* sp.; somatic embryogenesis; acid phosphatase.

* Estudiante de Postgrado en Botánica y **Profesores, respectivamente. UCV. Instituto de Biología Experimental. E-mail: anak_marciano@yahoo.com

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar, *Saccharum* sp., es un cultivo de importancia económica tanto a nivel mundial como en Venezuela, ya que no sólo se utiliza en la obtención de azúcar, sino también en la producción de alcohol, papel, madera, alimentación animal, etc. Uno de los sistemas de propagación *in vitro* más utilizado en el cultivo de la caña de azúcar es la embriogénesis somática. Durante este proceso pueden ocurrir cambios en el patrón de expresión de las proteínas, por lo que es necesaria la búsqueda de marcadores bioquímicos que permitan el estudio temprano de los eventos morfogénicos que ocurren durante la embriogénesis en plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción del callo: Para inducir la formación de callos se usaron secciones de hojas jóvenes de plantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) de la variedad V75-6, las cuales se sembraron en un medio de cultivo que contenía sales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 30 μ M de Dicamba, incubándose en oscuridad a 25 ± 1 °C durante 1 mes, según Marcano *et al.* (2002).

Extracción de proteínas: Después de 60 días de cultivo, se separó manualmente el callo embriogénico (E) del no embriogénico (NE), 1 g de callo se macero y resuspendió en 6 ml de tampón de extracción (50mM TRIS-HCL (pH 8), 5 % (v/v) glicerol, 0,1 mM EGTA, 0,2 KCL, 1,5% (v/v) PVP y 1% b-mercaptoetanol). El contenido de proteínas solubles se determinó mediante el método de Bradford (1976).

SDS-PAGE: La corrida electroforética se realizó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas, según Laemmli (1970).

Determinación de la Actividad fosfatasa ácida (ACP) en geles: Se llevó a cabo según el método señalado por Glasmann *et al.* (1988).

Actividad Enzimática: Se realizó el ensayo a punto final, según lo descrito por Gottlieb y Dwyer (1981) con ligeras modificaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo enzimático a punto final realizado para determinar diferencias en la actividad fosfatasa ácida en extractos de callos E y NE de caña de azúcar, reveló una mayor actividad (1,5 veces) en el tejido E con respecto al NE (ver Cuadro).

CUADRO. Actividad enzimática de extracto de callos E y NE de caña de azúcar. La actividad esta expresada en moles/h/mg de proteínas con un n= 3.

Extracto de Callo	Actividad Enzimática Específica
No embriogénico	1,876 ± 0,27
Embriogénico	2,847 ± 0,44

Con relación a la determinación de la actividad ACP en gels de poliacrilamida en condiciones nativas, se detecto una única banda en ambos extractos, no observándose diferencias significativas en la intensidad de las mismas (ver Figura), bajo las condiciones de tiempo y pH utilizadas en este ensayo.

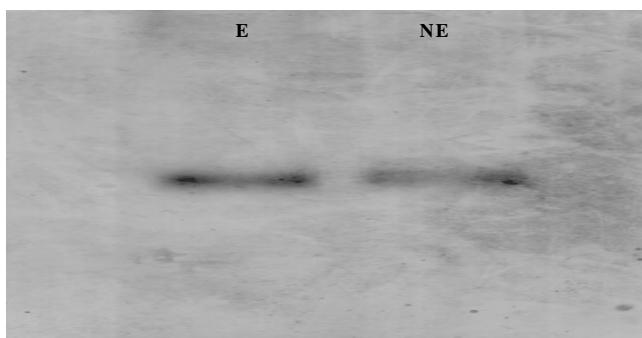


FIGURA. Actividad Fosfatasa Ácida en gel al 10% en condiciones nativas. (E) extracto de callo embriogénico, (NE) extracto de callo no embriogénico de caña de azúcar V75-6.

Las diferencias en la actividad ACP entre callos E y NE descritas en este trabajo sugieren que dicha actividad podría utilizarse como marcadora de los procesos de diferenciación que ocurren durante el cultivo *in vitro*. Estos resultados concuerdan con lo observado por Menéndez-Yuffá y García (1986) quienes detectaron una mayor expresión de la actividad ACP en callos E de café con respecto a los callos NE.

BIBLIOGRAFÍA

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

GLASMANN, B., G. de los REYES and G. S. KHUS 1988. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.) a key to the identification of 76 alleles at 24 loci. IRPS N° 134, November.

GOTTLIEB, M. and D. M. DWYER 1981. Leishmania donovani surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes. *Exp. Parasitol.* 52:117-128.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

MARCANO, A. K., P. GUEVARA, M. OROPEZA y E. GARCÍA. 2002. Optimización del proceso de embriogénesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar. *Acta científica Venezolana* 53:251-257

MENÉNDEZ-YUFFÁ, A. y E. GARCÍA. 1996: Análisis de patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. *fyton.* 58:15-22.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:474-497.

ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE PLANTAS DE *Stylosanthes capitata* Vog., REGENERADAS “*in vitro*” UTILIZANDO MARCADORES RAPDs¹

Norka Alexandra De Lima Méndez*, Maira Oropeza C.**,
Andreina Pérez* y Iselen Esther Trujillo Díaz*

RESUMEN

En Venezuela, las leguminosas cubren un área aproximada de 180 000 km² ubicadas sabanas tipo pastizales naturales lo que las hace el principal sustento en la alimentación de la ganadería de carne de la región y de más del 60% del país. *Stylosanthes capitata* Vog., en específico, posee una alta capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y un sistema radicular muy profundo, contribuyendo a la fertilidad y estabilidad de los suelos compactos. Sin embargo, su principal desventaja está en que su tasa reproductiva para la obtención de semillas es muy baja. Ello ha propiciado el establecimiento de varios procesos de regeneración *in vitro*, los cuales se han desarrollado con gran éxito, obteniéndose gran cantidad de plantas. A pesar de estos avances, esta metodología no ha sido evaluada respecto a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, la cual puede determinarse a través del uso de marcadores moleculares. En el trabajo, se estudió la estabilidad genética de plantas de *S. capitata* Vog., a partir de comparaciones de patrones de bandas de ADN amplificado al azar (RAPDs) entre la planta madre y las plantas “*in vitro*”, probándose 9 iniciadores de la serie OPC del 15 al 23 (Invitrogen) en un volumen final de reacción de 25 µl. Los resultados obtenidos mostraron amplificaciones de bandas nítidas y reproducibles originando fragmentos de ADN comprendidos entre 21220pb hasta 5000pb y los patrones de bandeado evidenciaron una alta estabilidad genética de las plantas regeneradas a partir del cultivo “*in vitro*”.

Palabras Clave: ADN; leguminosas; cultivo “*in vitro*”; estabilidad genética.

1 Trabajo financiado bajo el proyecto S1 99000106 por aportar el financiamiento de esta investigación.

* Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). San Antonio de Los Altos. Apdo. 47925. Caracas 1010A. Venezuela.
E-mail: norka11@hotmail.com

** Profesoras. Universidad Central de Venezuela. UCV. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental IBE. Apartado 47114. Los Chaguaramos. Caracas 1041A. Venezuela.
E-mail: moropez@ciens.ucv.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

ANALYSIS OF GENETIC STABILITY OF MICROPROPAGATED PLANTS OF *Stylosanthes capitata* Vog., USING RAPDs MARKERS

Norka Alexandra De Lima Méndez*, Maira Oropeza C.**,
Andreina Pérez* and Iselen Esther Trujillo Díaz*

SUMMARY

Legumes in Venezuela cover an area of an approximately 180 000 km², forming natural pasture savannas that act as a principal source of animal feeding and represents more than 60% of soils all over the country. *Stylosanthes capitata* Vog., has a high capacity to fasten nitrogen from the atmosphere, and very deep root systems that contribute with the fertility and stability of compact soils. However, the main disadvantage from these plants is their low sexual reproductive ratio, this has led to, the establishment of various *in vitro* regeneration processes which have been well developed and have permitted the production of big amounts of plants. Despite, all these advances this methodology, has not been evaluated regarding the stability of genetic regenerated plants of *in vitro* *Stylosanthes capitata* Vog., which can be determined by the use of molecular markers. In this research, genetic stability of *Stylosanthes capitata* Vog., was determined via RAPDs comparing DNA banding patterns of *in vitro* plants with mother plant. DNA extraction was made following Doyle and Doyle protocol, modified by Oropeza in 2001. For amplification, 9 arbitrary primers from the series OPC 15 to 23 (Invitrogen) were used, in a final volume of 25µl reaction. The results obtained demonstrated that all primers tested, produced sharp and reproducible bands originating DNA fragments ranging from 21220pb to 2000pb with a high genetic stability for regenerated plants from *in vitro* tissue culture.

Key Words: DNA; Legumes; Tissue culture; Genetic stability.

¹ Trabajo financiado bajo el proyecto S1 99000106 por aportar el financiamiento de esta investigación.

* Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). San Antonio de Los Altos. Apdo. 47925. Caracas 1010A. Venezuela.
E-mail: norka11@hotmail.com

** Profesoras. Universidad Central de Venezuela. UCV. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro de Botánica Tropical. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental IBE. Apartado 47114. Los Chaguaramos. Caracas 1041A. Venezuela.
E-mail: moropeza@ciens.ucv.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. Dentro de ellas, el género *Stylosanthes* (Aeschynomae Papilionoide) esta conformado por unas 30-40 especies, todas localizadas en las zonas templadas de las regiones tropicales y subtropicales de Suramérica, Latinoamérica, África, Asia y Australia (t'Manneje, 1984). De estas 30-40 especies sólo 3 son nativas de África (*S. erecta*; *S. fruticosa*; y *S. suborbiculata*) y sólo una proveniente de Asia (*S. sundaica*), lo que indica que las restantes 35 especies se encuentran en Suramérica, principalmente en Brasil, Colombia, Venezuela, etc. (Williams y Gardner, 1984).

Stylosanthes, específicamente en Venezuela se ubica hacia la región de los llanos (180,000 km²) en sabanas tipo pastizales naturales, con una gran adaptación a zonas áridas y condiciones adversas, condiciones típicas de suelos pobres, por lo que los requerimientos de nutrimentos necesarios para la planta son muy bajos. Sin embargo, presentan como una importante desventaja, su tasa reproductiva muy baja, la cual interfiere con su perpetuación como especie, lo que ha justificado la búsqueda de estrategias alternativas de propagación, entre las cuales se menciona el establecimiento de procesos de regeneración *in vitro*, como la micropropagación (Devarumath *et al.*, 2002).

Algunos trabajos relacionados con la regeneración *in vitro* de leguminosas incluyen la propagación, han desarrollado gran cantidad de plantas *in vitro*. Sin embargo, las plantas micropropagadas podrían sufrir ciertas modificaciones en el genoma y producir plantas *in vitro* diferentes a la planta original. Por lo que la utilización de marcadores basados en polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs) aparecen como una alternativa eficiente para realizar la evaluación de plantas *in vitro* específicamente en éste género (Kazan, 1993).

Desde un punto de vista práctico, la facilidad y rapidez con que los RAPDs pueden ser utilizados para la identificación de polimorfismos en cultivares de la especie *S. capitata* Vog., pueden detectar un cambio en una sola base en el sitio de unión con el iniciador o la inserción y delección en la región limitada por el iniciadores y también proveen una estrategia alternativa para el marcaje de sitios en el genoma que podrían ser obviados en el mapeo genéticos (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Martín *et al.*, 1991).

Kazan y Manners (1993), identificaron el mapa genético para el género *Stylosanthes* a partir de cruces adecuados, establecieron una metodología y determinaron la reproducibilidad de los RAPDs y así como realizaron la caracterización genética de loci seleccionados por estos marcadores. Y una de las formas de evaluar la eficacia de cualquier proceso de micropropagación *in vitro* está dado por la estabilidad genética de las plantas micropropagadas con respecto a la planta madre y una de las metodologías más adecuadas es la evaluación a partir de marcadores moleculares.

El objetivo de este trabajo estuvo dirigido analizar la estabilidad genética de plantas de *S. capitata* Vog., regeneradas *in vitro* utilizando marcadores RAPDs, y para ello se desarrollaron una serie de pasos previos como: el ensayo de diferentes metodologías para obtener un ADN apto, determinar la concentración de ADN ($\mu\text{g ul}^{-1}$) idónea para la óptima amplificación por RAPDs de estos fragmentos de ADN y comparar patrones de amplificación entre una planta madre y las plantas de *S. capitata* Vog., regeneradas por procesos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Las plantas madres de *S. capitata* Vog., se obtuvieron en la Estación Experimental “La Iguana” ubicada en Valle de la Pascua estado Guárico Venezuela. Se tomaron plantas en estado vegetativo y en floración y éstas fueron llevadas a vivero en donde se hicieron fertilizaciones y fumigaciones periódicas para su mantenimiento. Igualmente se tomaron plantas obtenidas por organogénesis indirecta en trabajos previos dentro del laboratorio. Estas se obtuvieron en medios MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con BA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) con un pH en el medio de 5,8 previo a ser esterilizados en autoclave a 120 Atms de presión. Las plantas *in vitro* fueron mantenidas en cuartos de crecimiento entre ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) bajo (16H) de fotoperíodo continuo. Después de haber obtenido cierta cantidad de plantas regeneradas *in vitro* de *S. capitata* Vog., se procedió a tomar una muestra al azar para ser analizadas a partir de marcadores moleculares RAPDs.

Extracción de ADN de *Stylosanthes capitata* Vog

Se utilizó (0,1 g) de tejido foliar de cada planta, *in vitro* e *in vivo*, previamente macerado en un mortero frío con nitrógeno líquido, para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de Doyle y Doyle (1990), modificado por Sambrook *et al.* (1989), para la determinación de la concentración de los ADNs se procedió a la cuantificación por espectrofotometría de la concentración y la pureza de los extractos se dedujo a partir de la relación entre las absorbancia 260/280 nm. Adicionalmente, para corroborar la calidad y la concentración de los ADNs aislados se empleó la técnica de electroforesis en geles 0,8% de agarosa), en (1X) buffer TBE (Tris-borato) y se utilizó bromuro de etidio (0,01ug μl^{-1}) para efectos de tinción. Los extractos originales de cada una de las muestras, se llevaron a una concentración de (50 ng μl^{-1}) en buffer (TE) para las reacciones de PCR.

Análisis a partir de marcadores moleculares RAPDs

Los análisis con marcadores RAPDs fueron llevados a cabo utilizando un set de (9) iniciadores de secuencia nucleotídica arbitraria (>15pb) Invitrogen, Operon Technologies, Inc., Alameda CA, USA. serie OPC (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23), tal como se aprecia en el Cuadro 1. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó según Kazan *et al.* (1993), conteniendo 100ng de ADN a una concentración de (50 ng μl^{-1}). Para un volumen final de reacción de (25 μl), se mezclaron: (10X) buffer de reacción (20 mM) Tris-HCL (pH 8,0), (100 mM) KCL, (0,1 mM) EDTA, (1 mM) DTT, (50%) glycerol, (0,5%) Tween® (20 y 0,5) Nonidet® - P40, (2 mM) MgCl₂, (0,2 mM) dNTP's, (10 picoM) del iniciador, (100 ng) de ADN, (1,0 U) por reacción de *Taq Polimerasa* de Promega y agua destilada estéril.

Las reacción de amplificación se realizó según Sambrook *et al.* (1989) bajos las siguientes condiciones de ciclado: Desnaturalización de la molécula por 1 minuto a 94 °C; 3 ciclos de alineación y alargamiento o extensión de 30seg a 35 °C; de 1:30 min a 72 °C y un tercer ciclo de 35 repeticiones de 15 seg a 94 °C; 35 °C por 30 seg y finalmente 1:30 min a 72 °C en la fase de elongación. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa (1,8%) Promega USA en buffer (1X) TBE (Trisborato) y se utilizó bromuro de etidio (0,5 ug ml^{-1}) para efectos de tinción y finalmente analizados utilizando un equipo Gel-Doc 2000 (Bio Rad, USA). Todas las reacciones fueron repetidas al menos una vez y sólo se consideraron las bandas nítidas y reproducibles.

CUADRO 1. Iniciadores de secuencia nucleotídica arbitraria utilizada para la amplificación de ADNs de *Stylosanthes capitata* Vog.

Iniciadores (Serie OPC) Invitrogen	Secuencias Arbitrarias
OPC 15	(DNA)-GAA CGG ACT C-
OPC 16	(DNA)-AAA GCT GCG G-
OPC 17	(DNA)-TGT CAT CCC C-
OPC 18	(DNA)-CAC ACT CCA G-
OPC 19	(DNA)-GTT GCC AGC C
OPC 20	(DNA)- GTG-CCT-AAC-C
OPC 21	(DNA)-TCA-CGT-CCA-C
OPC 22	(DNA)-CTC-TCC-GCC-A
OPC 23	(DNA)-GGA-TGA-GAC-C

Para establecer si existen o no diferencias a nivel del genoma entre las plantas madres (donadoras de explantes) y las plantas regeneradas *in vitro*, de *S. capitata* Vog., *in vitro* se utilizó el método de RAPDs William y Gardner (1984). Para este análisis, se realizaron amplificaciones del ADN extraído de (12) plantas escogidas al azar, de una población generada a partir de un proceso de organogénesis directa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a esta investigación, la obtención de los 11 diferentes ADNs se determinó a partir de la combinación de varios métodos: Sambrook (1989); Doyle y Doyle (1990) y Oropeza (2001). Con la utilización de esta combinación se obtuvieron ADN´s aptos para su amplificación por PCR. En la Figura 1 se muestran ADNs genómicos extraídos de 4 plantas regeneradas *in vitro* en un gel de agarosa (0,8%) y en el Cuadro 2 se muestra la pureza de los ADNs aislados con valores de absorbancia entre (1,8 y 2,0), lo que indica que están libres de polisacáridos, ácido ribonucleico (ARN) y/o cualquier elemento que interfieran con la amplificación de los marcadores tipo RAPDs.

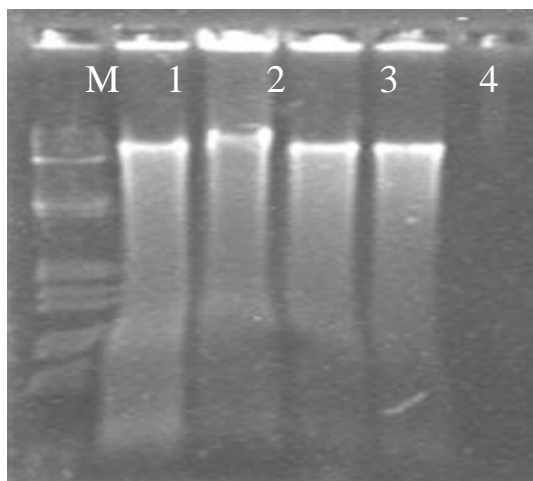


FIGURA 1. Integridad ADNs de plantas de *S. capitata* Vog., *in vitro* reveladas en geles de agarosa (0,8%); M=Marcador de Peso; 1, 2, 3 y 4 Plantas *in vitro* de *S. capitata* Vog.

Con los iniciadores seleccionados se logró obtener patrones de amplificación para las 11 muestras, utilizando los iniciadores OPC 15 al 23 (Cuadro 1). Las amplificaciones de los ADNs de las 10 plantas regeneradas *in vitro*, y 1 planta madre, con las condiciones de ciclado establecidas por Kazan *et al.* (1992), generaron un total de (95) fragmentos de ADN nítidos y reproducibles, con un peso molecular que va desde 1000pb hasta 15000pb. El rango total del número de fragmentos obtenidos fue entre 4 bandas (OPC 17) y 14 bandas (OPC 20 y 22) con los iniciadores (OPC 15, 16, 18, 19, 21 y 23) se obtuvieron un promedio de 11 fragmentos de ADN por cada iniciador (Ver Cuadro 3).

Por otro lado, de los (9) iniciadores probados todos generaron patrones con bandas monomórficas en las (11) plantas, confirmando la uniformidad genética de las plantas regeneradas *in vitro* (Figuras 2). Un ejemplo de los productos de amplificación generados con los iniciadores (OPC 18, 20 y 22) revelaron patrones de bandas que van desde 1000pb hasta 20000pb (Figuras 2). Finalmente del total de 95 bandas obtenidas en la amplificación con los 9 iniciadores utilizados en las 11 plantas analizadas fueron bandas monomórficas y ninguno de los iniciadores utilizados produjo patrones de bandas polimórficas (0%).

CUADRO 2. Cuantificación de la calidad de los ADNs obtenidos en plantas madre y plantas *in vitro* Protocolo (Doyle y Doyle 1990) modificado por Sambrook *et al.* (1989) y Oropeza (2001).

Muestras <i>S. capitata</i> Vog.	Calidad de ADNs Abs 260/280nm			
	1	2	3	4
Plantas <i>in vitro</i>	1,75	2,0	1,59	1,76
Plantas <i>in vivo</i>	1,86	1,79	1,88	1,85

Los resultados demuestran que los marcadores RAPDs pueden ser utilizados para determinar la estabilidad genética de plantas de *S. capitata* Vog., obtenidas por procesos *in vitro*, aunque solo se probaron 9 iniciadores con muy pocos ADNs de plantas (11), se observó un muy bajo nivel de polimorfismo en las plantas regeneradas comparado con la planta madre, lo que determinaría como un indicio de estabilidad genética de plantas *in vitro* de *S. capitata* Vog. Sin embargo, con los resultados aquí señalados, no se puede asegurar que existe una verdadera estabilidad genética en las plantas regeneradas, ya que es necesaria la utilización de una mayor cantidad de plantas y aumentar el número de iniciadores para determinar si realmente el proceso de micropropagación utilizado es estable genéticamente.

Estos resultados se contraponen a lo expuesto por dos autores Brown *et al.* (1993); Rani y *et al.* (1995), que apoyan la hipótesis de la ocurrencia de un cierto grado de variabilidad genética inducida por el cultivo de tejido; estos consideran que si existe una variabilidad que es generada por el proceso de cultivo *in vitro*, y por ello esta se debe verificar con el fin de evaluar los procesos de micropropagación (Chen *et al.*, 1998).

Sin embargo, algunos estudios de estabilidad genética de plantas, micropropagadas de *Picea mariana* (Isabel *et al.*, 1993), *P. Abies* (Fouree *et al.*, 1997), y algunas otras especies (Rani y Raina, 1998) han hecho gran énfasis en que las plantas regeneradas por procesos *in vitro*, pueden no ser exactamente iguales al genotipo madre, pero esto no indica que

estas sean diferentes en su fenotipo. Tal es el caso del estudio realizado por Devarumah *et al.*, en el 2002 con plantas micropropagadas de té proveniente de China e India, sólo dos de los clones obtenidos presentaron una estabilidad genética completa durante el proceso de micropropagación, lo que en el contexto de la comercialización indicó que aunque las plantas no eran genéticamente idénticas, no hubo diferencias significativas en cuanto a las características comerciales del té.

Por otro lado, los resultados concuerdan con los realizados por Rani *et al.* (1995), en el cual determinaron la estabilidad genética de 23 plantas de *Populus deltoides* regeneradas por procesos de micropropagación, para ello utilizaron 11 marcadores y como resultado obtuvieron que sólo 5 de los iniciadores generaron polimorfismos entre 6 plantas regeneradas, mientras que el resto de las plantas fueron monomórficas para los demás iniciadores, demostrando entonces una cierta estabilidad genética de las plantas micropropagadas (Rani *et al.*, 2000).

CUADRO 3. Número de productos de amplificaciones generados con el uso iniciadores de secuencia nucleotídica arbitrarias para el análisis de plantas regeneradas *in vitro* de *Stylosanthes capitata* Vog.

Iniciador (Invitrogen)	Secuencia Arbitraria	Nº de Bandas monomórficas generadas
OPC 15	(DNA)-GAA-CGG-ACT-C-	6
OPC 16	(DNA)-AAA-GCT-GCG-G-	9
OPC 17	(DNA)-TGT-CAT-CCC-C-	4
OPC 18	(DNA)-CAC-ACT-CCA-G-	13
OPC 19	(DNA)-GTT-GCC-AGC-C	11
OPC 20	(DNA)-GTG-CCT-AAC-C	14
OPC 21	(DNA)-TCA-CGT-CCA-C	13
OPC 22	(DNA)-CTC-TCC-GCC-A	14
OPC 23	(DNA)-GGA-TGA-GAC-C	11
Total		95

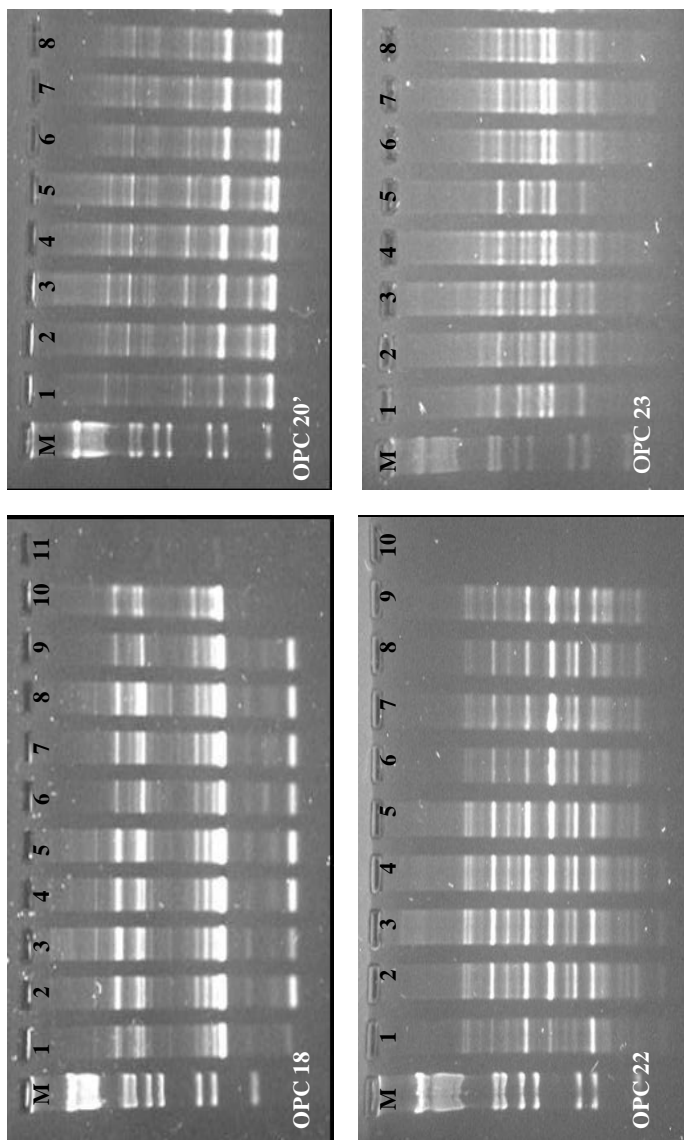


FIGURA 2. Amplificación con los iniciadores (OPC 18,20,22 y 23). M=Marcador de Peso 1 kb; (2 a10) plantas regeneradas *in vitro* y (1) planta madre de *S. capitata* Vog (11) control negativo.

En conclusión, en este trabajo se pudo establecer la metodología para el análisis de la estabilidad genética de plantas de *S. capitata* Vog., obtenidas por procesos de micropropagación. Los patrones obtenidos con los 9 iniciadores seleccionados (OPC 15-al 23), no revelaron variaciones en ninguna de las plantas regeneradas comparadas con la planta madre, lo que permitió considerar que los marcadores RAPDs son idóneos para detectar variaciones por procesos *in vitro* y evaluar la estabilidad genética de la plantas.

Se recomienda para investigaciones futuras aumentar tanto el tamaño de la muestra de plantas *in vitro* e *in vivo* como el número de iniciadores a utilizar para con el fin de establecer una verdadera existencia de la estabilidad genética de estas plantas y la información pueda ser generalizada para el proceso de micropropagación en la especie *S. capitata*. Vog.

AGRADECIMIENTO

A la Estación Experimental “La Iguana” por donar el material vegetal utilizado en esta investigación. A la Universidad Nacional Experimental “Simón Rodríguez” y a la UCV –IBE por permitir el desarrollo de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

BROWN, P., F. D. LANG, E. YKRANZ and H. LÖRZ. 1993. Analysis of a single protoplast and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Mol. Gen. Genet.* 237:311-317.

CAETANO-ANOLLES, G., B. J. BASSAM and P. M. GRESSHOFF. 1991. DNA Amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biol. Technol.* 9:553-557.

CHEN W. V., T. M. CHEN, Y. M. FU, R. M. HSIEH and S. CHEN. 1998. Studies of somaclonal variation in *Phalenopsis*. *Plant cell Rep.* 18:7-13 pp.

DEVARUMAH, R. M., S. NANDY, V. RANI, S. MARIMUTHU, N. MURALEEDHARAN and S. N. RAINA. 2002 RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China Type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type) Plant Cell Rep. 21:166-173.

DOYLE, J. J. and J. L. DOYLE. 1990. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull 19:11-15. **In:** Kazan K. J. Manners y D. F. Cameron. 1993 Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. Genome: (36):50-56.

FOURRE, K. L., L. BERGER, P. NIQUET and I. ANDRE. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenic, cytogenic, and molecular approaches. Theor Appl Genet. 94:159-169.

ISABEL, N., L. TREMBLAY, M. MICHAUD, F. M. TREMBLAY and J. BOUSQUET. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Picea mariana* (mill). BSP. Theor. Apl. Genet. 21:512-520.

KAZAN, K., J. MANNERS and D. F. CAMERON. 1993. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. Genome: (36):50-56.

LEEUEW, P. N., M. A MOHAMED-SALEEM and A. M. NYAMU. 1994. *Stylosanthes* as a forage and fallow crop. Proceedings of the Regional Workshop on the Use of *Stylosanthes* in West Africa held in Kaduna, Nigeria, 26–31 October 1992. ILCA (International Livestock Centre for Africa), Addis Ababa, Ethiopia. 346 pp.

MANNETJE, L. 1984 Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. **In:** The Biology and Agronomy of *Stylosanthes* (eds Stace, H. M. and Edey, L. A.), Academic Press, Sydney, Australia. **In:** Leeuw P N, Mohamed-Saleem M A and Nyamu A M (eds). 1994. *Stylosanthes* as a forage and fallow crop. Proceedings of the Regional Workshop on the Use of *Stylosanthes* in West Africa held in Kaduna, Nigeria, 26–31 October 1992. ILCA). pp. 1-21.

MARTIN, G. B., J. G. WILLIAMS and S. D. TANSKLEY. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 88:2.336-2.340.

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

OROPEZA, M. 2001. Laboratorio de Biotecnología Forestal en NCSU. *BRL Focus* 12:13-15.

RANI, V., A. PARIDA and S. N. RANIA. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* (Marsh). *Plant Cell Report* 14:459-462.

RANI, V. and S. N. RAINA. 1998 Genetic analysis of enhance axillary branching derived *Eccalyptus tereticornis* and *E. camaldulensis* plants. *Plant Cell Report*: 17-236-242. **In:** Devarumah R.M., S. Nandy; V. Rani; S. Marimuthu; N. Muraleedharan y S.N. Raina. 2002 RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing. *Camellia sinensis* (China Type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type) *Plant Cell Rep.* 21:166-173.

RANI, V., K. P. SINGH, B. SHIRAN, S. NANDY, S. GOEL, R. M. DEVARUMAH, H. L. SREENATH and S. N RANIA. 2000. Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organization among, high frequency somatic embryogenesis derived plants allotetraploid of *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Rep.* 19:1 013-1 020.

SAMBROOK, J., F. F. FRITSCH and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Sec. Ed. Cold. Spring Harbor Labora.

WILLIAMS, J. and C. J. GARDNER. 1984. Environmental constraints to growth and survival of *Stylosanthes*. **In:** Leeuw PN, Mohamed-Saleem MA y Nyamu 1994. *Stylosanthes* as a forage and fallow crop. Proceedings of the Regional Workshop on the Use of *Stylosanthes* in West Africa held in Kaduna, Nigeria, 26–31 October 1992. ILCA (International Livestock Centre for Africa), Addis Ababa, Ethiopia. 346 pp.

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE ARROZ CON ALTA CAPACIDAD DE AJUSTE OSMÓTICO PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA TOLERANCIA A LA SEQUÍA¹

Thaura Ghneim-Herrera*, Arnaldo Rosales**,
Marwan Aguilar**, Alejandro J. Pieters*,
Iris Pérez Almeida*** y Gelis Torrealba****

RESUMEN

Su disección genética, mediante la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTLs), es parte de la estrategia para el mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía en accesiones del germoplasma nacional. Como primer paso dentro de esta estrategia de caracterizar la capacidad de ajuste osmótico (AO) en 7 cultivares de arroz de riego ('Araure 4', 'Araure 50', 'Cimarrón', 'Fonaiap 1', 'Fonaiap 2000', 'Línea 17' y 'Venezuela 21') sometidos a déficit hídrico bajo condiciones de invernadero. El grado de ao varió significativamente entre los cultivares estudiados en el rango 0,08-0,5 MPa. 'Fonaiap 2000' mostró la mayor capacidad de AO con valores ~0,5 MPa; esto estuvo asociado a la acumulación de carbohidratos bajo condiciones de sequía. Los síntomas de estrés hídrico (enrollamiento foliar) aparecieron más tardíamente en 'Fonaiap 2000' que en el resto de los cultivares y a potenciales hídricos más negativos ($\psi_h \sim -3,1$ MPa), lo cual evidencia la efectividad del AO para el mantenimiento de un estatus hídrico favorable. Los valores de AO medidos son similares al de otras variedades de arroz utilizadas en la actualidad para el mapeo de QTLs asociados a esta característica, lo cual hace de 'Fonaiap 2000' una candidata para el desarrollo de poblaciones de mapeo, y una fuente potencial para el mejoramiento de esta característica dentro del germoplasma nacional.

Palabras Clave: Arroz; *Oryza sativa* L.; tolerancia a la sequía; mejoramiento genético; ajuste osmótico; QTLs; 'Fonaiap 2000'.

1 Trabajo financiado por el Programa BID-FONACIT II, sub-proyecto F-2004000371 y Fonacit a través del financiamiento F-2001000902.

* Investigadores y **Profesionales Asociado a la Investigación. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apdo. 21827. Caracas, Venezuela.

E-mail: thgneim@ivic.ve

*** Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apdo 2103. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

**** Investigador. INIA. CIAE Guárico. Apdo N°14. Zona Postal 2312. Estado Guárico. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

IDENTIFICATION OF RICE CULTIVARS WITH HIGH OSMOTIC ADJUSTMENT CAPACITY FOR THE GENETIC IMPROVEMENT OF DROUGHT TOLERANCE¹

Thaura Ghneim-Herrera*, Arnaldo Rosales**,
Marwan Aguilar**, Alejandro J. Pieters*,
Iris Pérez Almeida*** y Gelis Torrealba****

SUMMARY

Its genetic dissection, through the identification of quantitative trait loci (QTLs) is an important component of the strategy for the genetic improvement of drought tolerance in local rice cultivars. As a first step within this strategy, we measured the capacity of osmotic adjustment (OA) in 8 local rice varieties ('Araure 4', 'Araure 50', 'Cimarrón', 'Línea 17', 'Fonaiap 1', 'Fonaiap 2000' and 'Venezuela 21') subjected to water deficit (drought) under glasshouse conditions. The OA values varied between 0.08-0.6 MPa. 'Fonaiap 2000' showed the highest capacity for OA with values ca. 0.5 MPa. In this cultivar, OA was associated with the accumulation of carbohydrates under drought stress. Drought stress symptoms (leaf rolling) appeared later and at more negatives leaf water potentials ($\psi \sim -3.1$ MPa) in 'Fonaiap 2000' than in the rest of the cultivars studied, indicating that OA is an effective mechanism for maintaining a favorable water status. The values of OA measured in this study are similar to those reported for other cultivars used for mapping QTLs associated to this trait. Thus, 'Fonaiap 2000' appears as a good candidate for developing mapping populations for QTL identification and as a potential donor for the improvement of osmotic adjustment capacity in our rice germplasm.

Key Words: Rice; *Oryza sativa* L.; drought tolerance; osmotic adjustment; QTLs; 'Fonaiap 2000'.

1 Trabajo financiado por el Programa BID-FONACIT II, sub-proyecto F-2004000371.

* Investigadores y **Profesionales Asociado. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apdo. 21827. Caracas, Venezuela. E-mail: thgneim@ivic.ve

*** Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apdo 2103. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

**** Investigador. INIA. CIAE Guárico. Apdo N°14. Zona Postal 2312. Estado Guárico. Venezuela.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

El ajuste osmótico (AO) es un mecanismo adaptativo mediante el cual, bajo condiciones de estrés, las plantas son capaces de acumular solutos. Esta acumulación de solutos resulta en la disminución del potencial osmótico y en el mantenimiento de altos potenciales de turgencia, lo cual permite el mantenimiento de diversas funciones celulares (Blum 1988).

El AO, definido como la reducción del potencial osmótico mediante el incremento de la concentración intracelular de solutos, representa una característica clave en la determinación de la tolerancia a la sequía en arroz, *Oryza sativa* L., particularmente en variedades de riego.

La capacidad de AO ha sido propuesta como una característica clave en la determinación de la tolerancia a la sequía exhibida por diversas especies de cultivo. En arroz se ha demostrado que el AO representa un mecanismo efectivo para retrasar el enrollamiento foliar (EF), la muerte de tejidos foliares y la senescencia bajo condiciones de sequía (Hsiao *et al.* 1984). Sin embargo, una relación clara entre la capacidad de AO y el rendimiento bajo condiciones de sequía no ha sido claramente demostrada para esta especie.

En este estudio se señala el grado de AO en 9 cultivares de arroz, 7 de ellos pertenecientes al germoplasma nacional y examinando el papel de este mecanismo en el retraso de la aparición de síntomas de estrés hídrico como el EF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las semillas de los cultivares Araure 4, Araure 50, Cimarrón, Fonaiap 1, Fonaiap 2000, Línea 17 y Venezuela 21 fueron suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Estos cultivares representan accesiones del germoplasma nacional de arroz, cultivados bajo condiciones de riego. Las semillas de las variedades testigos ‘Nipponbare’ (*O. sativa*, spp. *japónica*, variedad de secano) e ‘IR64’ (*O. sativa*, spp. *indica*, variedad de riego) se obtuvieron a través del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colombia).

Condiciones experimentales. Los experimentos se realizaron bajo condiciones de invernadero en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC-Centro de Ecología) durante los meses de julio-agosto del 2005. Las semillas de los distintos cultivares fueron germinadas secuencialmente con la finalidad de hacer coincidir sus fechas de floración y realizar mediciones simultáneas en todos los materiales.

Dos semanas luego de la germinación, las plántulas fueron transplantadas a cilindros de PVC (0,10 x 0,35 m) rellenos con suelo proveniente del campo experimental del Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Guárico (Bancos de San Pedro), suplementado con N-P-K a una tasa de 150-80-80 kg ha⁻¹.

Se cultivaron un total de 24 plantas por cultivar (una planta por cilindro), las cuales se mantuvieron bajo condiciones de irrigación hasta alcanzar 50% de floración. A partir de este momento, se inició el tratamiento de sequía en la mitad de las plantas de cada cultivar mediante la suspensión del riego. La mitad restante (control) recibió irrigación durante el resto del experimento.

Determinación de ψ_h , ψ_s , CRA, AO, CNE y EF. Se realizaron mediciones inter-diarias del potencial hídrico (ψ_h), potencial osmótico (ψ_s), contenido relativo de agua (CRA) y concentración de carbohidratos no estructurales (CNE) al amanecer (6:00-7:00 a.m) y al mediodía (12:00-1:00 p.m) durante 12 días en los tratamientos de sequía y control. Todas las mediciones se realizaron por triplicado sobre hojas banderas completamente expandidas. Para la medición de ψ_h se utilizó una cámara de presión Soilmoisture Modelo 3000 (Soilmoisture Equipment Corp., Santa Bárbara, USA).

El ψ_s se calculó utilizando la ecuación de van Hoff, a partir de los valores de osmolalidad obtenidos con un osmómetro Wescor Modelo 5520 (Wescor Inc, Utah, USA). El CRA fue calculado según Barrs y Weatherley (1962), con rehidratación por 4-h y posterior desecación a 80 °C por 48-h.

El grado de AO se calculó según Ludlow *et al.* (1983), con cada ψ_s corregido por su respectivo CRA y utilizando una constante de 18% como la fracción apoplástica de agua en arroz (Turner *et al.* 1986). La concentración de CNE se determinó siguiendo la metodología descrita

por Dubois *et al.* (1956). El grado de enrollamiento foliar (EF) se evaluó al mediodía (12:00-1:00 p.m) siguiendo el sistema descrito por el Instituto Internacional de Investigaciones en Arroz (IRRI 2002).

Desarrollo radical. Las plantas control de cada variedad fueron cosechadas al final de cada experimento a fin de determinar su desarrollo radical. Se midieron 6 plantas por variedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La severidad y progreso del estrés hídrico en los cultivares estudiados fueron monitoreados a través de la aparición de síntomas de EF. El EF es un mecanismo de evasión que permite a las especies de gramíneas, incluido el arroz, disminuir el área foliar expuesta y minimizar la transpiración bajo condiciones de déficit hídrico (O'Toole, 1982).

La ocurrencia y grado de EF son ampliamente utilizados como indicadores visuales de la susceptibilidad de variedades de arroz al déficit hídrico (IRRI 2002), mayor el grado de enrollamiento menor la tolerancia a la sequía.

Los cultivares analizados en este estudio muestran diferencias en relación a la aparición de los primeros síntomas de EF y al estatus hídrico (ψ_h) al cual el máximo enrollamiento de las hojas es alcanzado (Cuadro 1). Usando estos criterios, 'Fonaiap 2000' exhibe la mayor tolerancia pues muestra el máximo EF luego de 12 días sin riego (DDS) y con ψ_h muy negativos, mientras que en los cultivares más susceptibles éste se observa a los 4 DDS (Cuadro 1).

Una relación directa entre la ocurrencia de EF y la capacidad de realizar AO ha sido demostrada en algunas variedades de arroz (Hsiao *et al.*, 1984). En este estudio se encuentra que la menor susceptibilidad de 'Fonaiap 2000' al estrés hídrico, medida como el retraso en la ocurrencia de EF, está asociada a un alto grado de AO (Cuadro 2). De hecho, 'Fonaiap 2000' exhibe el mayor grado de AO entre los cultivares locales estudiados. En contraposición, los cultivares locales más susceptibles al déficit hídrico en este estudio tales como 'Venezuela 21' (Cuadro 1) exhibieron una baja capacidad de AO (Cuadro 2).

CUADRO 1. Relación entre el grado de enrollamiento foliar (EF), el potencial hídrico (ψ_h) y los días bajo tratamiento de sequía (DDS) en los cultivares estudiados.

	ψ_h control (-MPa)	ψ_h (-MPa) al grado EF indicado 1	9	DDS al grado EF 9
Araure 4	1,7 \pm 0,1	1,8	2,9	6
Araure 50	1,5 \pm 0,0	1,7	4,3	6
Cimarrón	1,9 \pm 0,2	-	3,3	8
Fonaiap 1	1,5 \pm 0,1	1,6	3,3	8
Fonaiap 2000	1,3 \pm 0,3	2,2	3,4	12
Venezuela 21	1,6 \pm 0,2	1,9	2,3	4
Línea 17	1,7 \pm 0,1	2,6	3,8	6
Nipponbare	1,4 \pm 0,1	1,8	2,8	4
IR64	1,5 \pm 0,2	2,5	No obs.	No obs.

CUADRO 2. Ajuste osmótico, concentración de carbohidratos no estructurales (CNE) y longitud de la raíz principal en los cultivares estudiados.

	Ajuste osmótico (MPa)	Concentración de CNE ($\mu\text{mol cm}^{-2}$)		Longitud de raíz principal (cm)
		Control	Sequía	
Araure 4	0,14 \pm 0,04	10,2 \pm 1,6	9,2 \pm 1,8	37,8 \pm 4,0
Araure 50	0,11 \pm 0,07	12,7 \pm 2,6	13,8 \pm 0,1	34,4 \pm 4,8
Cimarrón	0,21 \pm 0,15	12,5 \pm 6,5	15,1 \pm 0,8	29,9 \pm 5,5
Fonaiap 1	0,18 \pm 0,09	18,1 \pm 1,6	14,0 \pm 2,7	28,1 \pm 5,3
Fonaiap 2000	0,43 \pm 0,16	14,0 \pm 1,3	18,4 \pm 1,4	40,3 \pm 5,8
Venezuela 21	0,16 \pm 0,03	14,1 \pm 3,8	15,9 \pm 9,5	31,5 \pm 12,7
Línea 17	0,15 \pm 0,04	9,1 \pm 0,4	7,6 \pm 0,5	37,4 \pm 5,9
Nipponbare	0,08 \pm 0,04	16,1 \pm 1,1	14,0 \pm 0,2	32,9 \pm 5,7
IR64	0,56 \pm 0,18	11,5 \pm 2,4	17,4 \pm 2,0	26,5 \pm 5,9

El EF 1 corresponden al inicio del doblamiento de la hoja, mientras EF 9 a hojas apretadamente enrolladas (IRRI 2002). IR64 no exhibió EF 9 al final del experimento (12 días). Se incluyen como referencia los valores de ψ_h medidos en las plantas control de cada cultivar. Los valores de ψ_h mostrados corresponden a las mediciones realizadas al mediodía. Los valores de ψ_h representan el promedio \pm desviación estándar ($n=3$).

La identidad de los solutos acumulados en el proceso de ajuste osmótico en respuesta al déficit hídrico varía según la especie de cultivo; estos solutos incluyen cationes inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos (Turner y Jones 1980). En arroz, sin embargo, la identidad de los solutos osmoticamente activos no ha sido claramente demostrada (Nguyen *et al.* 1997). En este estudio se observó que 'Fonaiap 2000' e 'IR64', los dos cultivares con los mayores valores de ajuste osmótico, mostraron un incremento de la concentración de carbohidratos no estructurales bajo condiciones de sequía (Cuadro 2), lo cual indica un posible papel de estos compuestos en el proceso de ajuste osmótico observado.

En algunas variedades de arroz, el retraso en la aparición del enrollamiento foliar está asociado con una mayor capacidad para evitar la deshidratación mediante el desarrollo de un sistema radical profundo (Fukai y Cooper 1995). Así, un desarrollo diferencial de raíces puede ser un factor determinante de las diferencias en la tolerancia a la sequía exhibida por distintas variedades de arroz. Entre los cultivares estudiados, 'Fonaiap 2000' exhibió la mayor longitud radical (Cuadro 2). Sin embargo, ésta no fue significativamente diferente a las exhibidas por 'Venezuela 21' y la 'Línea 17', dos cultivares comparativamente más susceptibles al déficit hídrico.

Las mediciones de AO y CNE se realizaron luego de 3D bajo sequía. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Los de longitud de la raíz principal representan el promedio \pm desviación ($n=6$).

En experimentos previos en los que se compararon 'Fonaiap 2000' y 'Araure 4', resultó evidente que 'Fonaiap 2000' presenta una relación raíz-vástago (R/V) alta (0,8) que se mantiene invariable con la sequía, mientras en 'Araure 4' la R/V se incrementa en un 20 % pero en un valor menor que en 'Fonaiap 2000' (0,6) (Pieters y El-Souki, datos sin publicar). Sin embargo las diferencias en R/V no significaron variaciones en la

velocidad de deshidratación con la suspensión del riego (Pieters y El-Souki, 2005). Estos resultados indican que, al menos bajo nuestras condiciones experimentales, las diferencias en tolerancia observadas no están directamente relacionadas con la profundidad de raíces. No obstante, potenciales diferencias en el desarrollo radical entre los cultivares estudiados podrían ejercer un efecto importante sobre las respuestas de éstas al déficit hídrico en condiciones de campo.

El AO ha sido propuesto como un mecanismo clave para el mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía. Sin embargo, no existen evidencias claras de que la mayor capacidad de AO exhibida por algunas variedades de arroz se traduzca en un mayor rendimiento bajo condiciones de estrés (Fukai y Cooper, 1995). Los resultados obtenidos en este estudio indican que las diferencias en el grado de AO observadas entre los cultivares locales estudiados se relacionan con su susceptibilidad/tolerancia a la sequía, cuando ésta es cuantificada mediante el grado de EF.

Sin embargo, experimentos adicionales, tanto bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio como en campo, se requieren para establecer la relación entre el AO, el grado de EF y la respuesta de cada variedad al déficit hídrico en términos de rendimiento.

Diversos trabajos indican que la capacidad de realizar AO es mayor en variedades de arroz de riego que en variedades de secano y que existe dentro de cada grupo variabilidad genética para este carácter (Fukai y Cooper 1995). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que dentro del grupo de cultivares del germoplasma nacional existe una amplia variación en el grado de AO alcanzado bajo condiciones de sequía (0,08-0,5 MPa) como se aprecia en el Cuadro 2.

En este estudio el grado de AO fue calculado utilizando la metodología propuesta por Ludlow *et al.* (1983). Comparaciones entre los datos del trabajo y los obtenidos por otros investigadores mediante la misma metodología (Babu *et al.*, 1999) ubican a 'Fonaiap 2000' como una variedad con capacidad de AO media. Específicamente, 'Fonaiap 2000' exhibe valores de AO similares a 'IR64', una variedad de riego incluida en este estudio como referencia (Babu *et al.*, 1999).

La capacidad de AO exhibida por 'Fonaiap 2000' indica que esta variedad podría ser utilizada como progenitor en el desarrollo de poblaciones de

mapeo de QTLs reguladores de la capacidad de AO y como potencial donante de este carácter en programas de mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía.

Los resultados de esta investigación ponen de manifiesto la complejidad de la respuesta del arroz al déficit hídrico. Así mismo, evidencian la necesidad de evaluar la tolerancia a la sequía de una manera integrada, involucrando aspectos y procesos a varios niveles de organización.

CONCLUSIONES

- Los cultivares estudiados exhiben distinta tolerancia a la sequía, cuando ésta es medida como el grado de EF bajo condiciones de estrés hídrico. Estas diferencias se relacionan con el grado de AO exhibido por los distintos cultivares. ‘Fonaiap 2000’ mostró la mayor tolerancia pues los primeros síntomas de EF aparecieron a ψ_h más negativos que en el resto de los cultivares, y a su vez exhibió el mayor grado de AO.
- La acumulación de CNE exhibida por ‘Fonaiap 2000’ bajo condiciones de sequía indica un posible papel de estos compuestos en el proceso de AO observado.
- Aún cuando este estudio indica una posible relación entre el grado de AO y la tolerancia a la sequía exhibida por los cultivares de arroz estudiados, se requieren experimentos adicionales para establecer la relación entre el AO, el grado de EF y la respuesta de cada cultivar al déficit hídrico en términos de rendimiento.
- ‘Fonaiap 2000’ exhibe una capacidad de AO media lo cual hace de esta variedad una candidata para el desarrollo de poblaciones de segregantes para el mapeo de QTLs, y una fuente potencial para el mejoramiento de esta característica dentro del germoplasma nacional.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos especialmente el apoyo brindado por la Unidad de Ecología Genética (Centro de Ecología, IVIC) y al FONACIT.

BIBLIOGRAFÍA

- BABU R.C, M.S. PATHAN, A. BLUM and H.T. NGUYEN. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Sci.* 39:150-158.
- BARRS, H. D. and P. E. WEATHERLEY. 1962. A re-examination of the turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413-428.
- BLUM, A. 1988. Drought resistance. **In:** Plants breeding for stress environments. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 43-76.
- DUBOIS, M., K. A. GILLES and J. K. HAMILTON. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- FUKAI, S. and M. COOPER. 1995. Development of drought resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crop Research* 40:67-86.
- HSIAO, T. C., J. C. O'TOOLE, E. B. YAMBAO y N. C. TURNER. 1984. Influence of osmotic adjustment on leaf rolling and tissue death in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 75: 338-341.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). 2002. Standard Evaluation System for Rice. IRRI. Los Baños, Filipinas. 56 pp.
- LUDLOW, M. M., A. C. P. CHU, R. J. CLEMENTS and R. G. KERSLAKE. 1983. Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 10:119-130.
- NGUYEN, H. T., R. C. BABU and A. BLUM. 1997. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Sci.* 37:1 426-1 434.
- O'TOOLE, J. C. 1982. Adaptation of rice to drought prone environments. Drought resistance in crops with emphasis on rice. IRRI, Los Baños, Filipinas. p. 195-213.
- PIETERS, A. J. and S. EL-SOUKI. 2005. Effects of drought during grain filling on PS II activity in rice. *J Plant Phys.* 162:903-911.

TURNER, N. C. and M. M. JONES. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. **In:** N.C. Turner, P.J. Kramer, eds, *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. John Wiley y Sons, New York. pp. 78-103.

TURNER, N. C., J. C. O'TOOLE, R. T. CRUZ, E. B. YAMBAO, S. AHMAD, O. S. NAMUCO and M. DINGKUHN. 1986. Response of seven diverse rice cultivars to water deficit. II. Osmotic adjustment, leaf elasticity, leaf extension, leaf death, stomatal conductance and photosynthesis. *Field Crop Res.* 13:273-286.

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
EN DOS ESPECIES DEL GÉNERO *PLANTAGO*
(*Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth)¹**

Jorge A. González A.*, Maira Oropeza C.,
Teresa Edith Vargas C.** y Eva de García****

RESUMEN

Con la finalidad de inducir el proceso de embriogénesis somática, segmentos de hojas jóvenes de plantas de *Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth fueron cultivadas "in vitro" en un medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con mioinositol (10 mg l⁻¹), tiamina (0,4 mg l⁻¹), piridoxina (0,5 mg l⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg l⁻¹), glicina (2,0 mg l⁻¹), sacarosa (3%) y empleando como agente gelificante agar (8 g l⁻¹). Se probaron diferentes concentraciones (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 y 1,0 mg l⁻¹) de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D). A partir de la tercera semana de cultivo, se desarrolló un callo de apariencia nodular, friable y con una coloración entre pardo claro y crema. La inducción del callo varió levemente dependiendo de la concentración del regulador de crecimiento suministrada al medio. La formación de callo, así como la aparición de embriones somáticos se pudo observar al final de la cuarta semana de cultivo. Alrededor de un 65% de los explantes de las dos especies produjeron embriones después de la octava semana de cultivo, con ausencia de sincronización en los diferentes estados de desarrollo embrionario.

Palabras Clave: Llantén; medicinal; embriones somáticos.

1 Proyecto individual financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. CDCH/UCV P.I. N° 03, 33, 5447, 2004.

* Profesor. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR). Estudiante de Postgrado UCV. Facultad de Ciencias. E-mail: jtgonzalez@hotmail.com

** Profesores. UCV. Facultad de Ciencias. Instituto de biología Experimental. Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

**SOMATIC EMBRYOGENESIS
FOR TWO SPECIES OF *PLANTAGO* GENUS
(*Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth)**

Jorge A. González A.*, Maira Oropeza C.,
Teresa Edith Vargas** y Eva de García****

SUMMARY

With the purpose of inducing the process of somatic embryogenesis, segments of young leaves of *Plantago major* L. and *Plantago hirtella* Kunth plants were cultured “*in vitro*” in Murashige and Skoog (MS) media, supplemented with myoinositol (10 mg l⁻¹), thiamine (0,4 mg l⁻¹), pyridoxine (0,5 mg l⁻¹), nicotinic acid (0,5 mg l⁻¹), glycine (2,0 mg l⁻¹), sucrose (3%) and solidified with agar (8 g l⁻¹). Different 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations were tested (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 and 1,0 mg l⁻¹). Since the third week of culture, a nodular and friable light brown callus developed. One week later, somatic embryos originated on callus surface. Around 65% of the explants produced embryos at the eighth week of culture, with absence of synchronization in the different stages of embryo development.

Key Words: Common plantain; medicinal; somatic embryos.

1 Proyecto individual financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. CDCH/UCV P.I. N° 03, 33, 5447, 2004.

* Profesor. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR). Estudiante de Postgrado UCV. Facultad de Ciencias. E-mail: jtgonzalez@hotmail.com

** Profesores. UCV. Facultad de Ciencias. Instituto de biología Experimental. Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales poseen un alto valor económico desde el punto de vista farmacológico. Las investigaciones actuales se han enfocado en la búsqueda de estrategias biotecnológicas que permitan alcanzar una mayor eficiencia en la propagación, crecimiento, rendimiento, extracción y separación de compuestos vegetales naturales con actividad biológica y terapéutica.

El género *Plantago*, agrupa hierbas perennes y anuales, de las cuales algunas especies son conocidas por sus propiedades medicinales (Ronsted *et al.*, 2003). *P. major* y *P. hirtella*, conocidas como Llantén y Falso Llantén, respectivamente, crecen de manera silvestre en el territorio venezolano y son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de la piel, enfermedades infecciosas, afecciones de los órganos digestivos, y como antipirético, entre otros (Caraballo *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2002; Samuelson, 2000; Mederos *et al.*, 1997-1998). Diferentes técnicas de cultivo “*in vitro*” han sido descritas para plantas de este género (Barna y Wakhlu, 1989; Pramanik *et al.*, 1995; Mederos *et al.*, 1997-1998; Das y Raychaudhuri, 2001); sin embargo, no existen estudios del uso de hojas como explantes.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el de inducir la formación de callo y embriones somáticos a partir de segmentos de hojas jóvenes de *P. major* y *P. hirtella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Segmentos de hojas (0,25 cm²) fueron tomados de plantas de 20 días de germinadas “*in vitro*” y usados como explantes. Para la inducción del callo y la diferenciación de embriones se utilizó medio MS (1962) suplementado con mioinositol (10 mg l⁻¹), tiamina (0,4 mg l⁻¹), piridoxina (0,5 mg l⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg l⁻¹), glicina (2,0 mg l⁻¹), sacarosa (3%) y diferentes concentraciones de 2,4-D (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 y 1,0 mg l⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5,8 y se empleo agar (8 g l⁻¹) como agente gelificante, para luego autoclavar a 15 libras de presión y 120 °C por 20 minutos.

Para la inducción del callo, 10 segmentos de hoja fueron inoculados en frascos con 25 ml de medio. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 28 °C y se realizaron tres réplicas por tratamiento.

El ensayo se monitoreó semanalmente después de su inicio, y a partir de la cuarta semana se tomaron las observaciones. El experimento se llevó a cabo bajo un diseño factorial. Se utilizó un test *a posteriori* de comparación de medias de Tukey para *n* iguales (Montgomery, 1991). Todos los datos fueron procesados con el programa estadístico Minitab, versión 13,20 año 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las concentraciones de 2,4-D evaluadas indujeron la formación de callo a partir de la tercera semana de cultivo, indistintamente de la especie de *Plantago*. Para las dos especies se detectaron diferencias significativas en el efecto de la concentración de 2,4-D al compararlo con el tratamiento control sin el regulador de crecimiento.

Tales resultados parecieran sugerir que para ambas especies de *Plantago*, es indispensable el uso del 2,4-D para la formación de callo. Los resultados obtenidos en esta investigación apoyan los obtenidos por Rout *et al.* (2000) quienes no encontraron señales de formación de callo cuando cultivaron explantes de *Chepahelis ipecacuana* en un medio libre de 2,4-D, pero difieren de los obtenidos por Waklhu y Barna, (1989) que observaron la formación de callo compacto en explantes de raíz de *Plantago ovata* Forsk en un medio libre del regulador de crecimiento.

Generalmente la formación de callo es estimulada en función de la concentración exógena del regulador de crecimiento vegetal utilizado (Rout *et al.*, 2000); sin embargo, también hay que tomar en cuenta la concentración endógena de auxinas en el explante, el tipo de explante y el estado fisiológico del mismo e incluso, la especie vegetal utilizada.

Alrededor de un 65% del total de los explantes respondió hacia la formación de callo embriogénico. A partir de la sexta semana la formación de embriones comenzó a hacerse evidente en ambas especies (Figura 1). El análisis estadístico ($P > 0,05$) reveló que el número de embriones somáticos formados en callos de *P. hirtella* fue mayor que el observado en callos *P. major*.

En la Figura 2 se observan los valores promedio del número de embriones por cada 0,25 cm² de callo ($0,1 \pm 0,02$ g) de *P. major* y *P. hirtella* para la octava semana de cultivo.

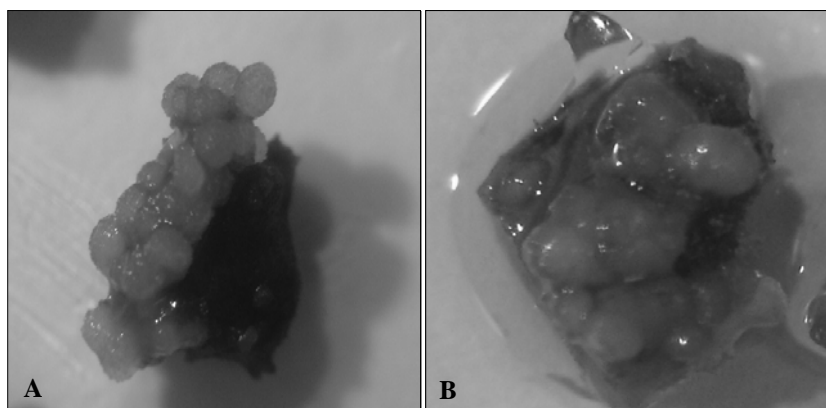


FIGURA 1. Grupo de embriones globulares en la superficie del callo generado a partir de explante de hoja de *P. major* (A) y de *P. hirtella* (B)

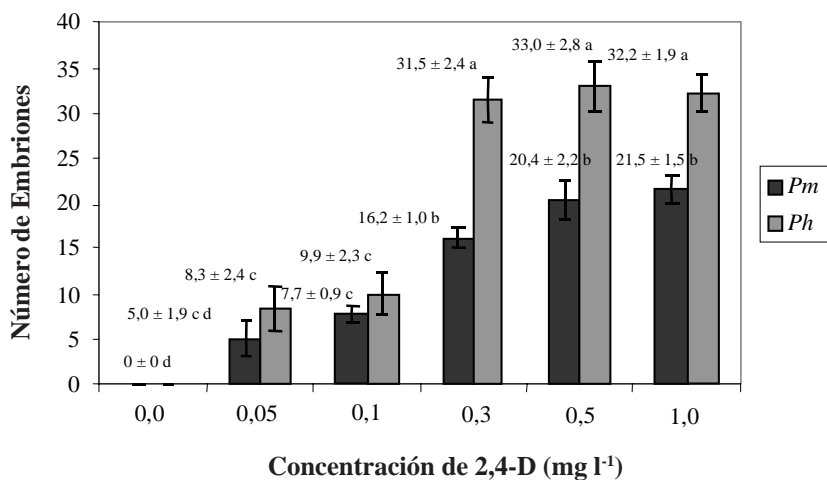


FIGURA 2. Efecto de la concentración de 2,4-D sobre el número de embriones producidos en 0,1 ± 0,02 g de callo de *P. major* (*Pm*) y de *P. hirtella* (*Ph*) a las 8 semanas de cultivo. Se grafican los valores promedio ± ES. Letras diferentes en cada especie indican diferencias significativas ($P < 0,05$). $R^2 = 0,82$. Coef. Var. = 37,5.

Los resultados de la investigación concuerdan con los obtenidos para *Cephaelis ipecacuana* (Rout *et al.*, 2000) y para *Plantago ovata* (Das y Raychaudhuri, 2001), quienes alcanzaron un mayor número de embriones somáticos en callos embriogénicos cultivados en un medio MS (1962) suplementado con 1 mg l⁻¹ de 2,4-D.

En general, se pudo observar que la formación de embriones somáticos depende fuertemente no sólo de la especie de *Plantago*, sino también de la concentración del regulador de crecimiento vegetal utilizado. Los resultados permiten concluir que concentraciones entre 0,3 y 1,0 mg l⁻¹ de 2,4-D favorecen la formación y desarrollo de callo y de los embriones somáticos, y que la especie *P. hirtella* muestra una mejor respuesta en comparación con *P. major* bajo todas las concentraciones evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

BARNA, K. S. and A. K. WAKLHU. 1989. Shoot regeneration from callus derived root cultures of *Plantago ovata* Forsk. Isubgol. Phytomorphology. 39:353-355.

CARABALLO, A., B. CARABALLO and A. RODRÍGUEZ-ACOSTA. 2004. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. Revista de la Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 37(2):186-188.

DAS, M. and S. RAYCHAUDHURI. 2001. Enhanced development of somatic embryos of *Plantago ovata* Forsk by additives. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 37:568-571.

HERNÁNDEZ, J., H. VALERO y R. GIL. 2002. 23 especies vegetales medicinales de uso frecuente en la población de Tabay. Revista de la Facultad de Farmacia. Consejo de Publicaciones. U.L.A. Vol. 44:51-58.

MEDEROS S., C. MARTÍN, E. NAVARRO and M. J. AYUSO. 1997-1998. Micropropagation of a medicinal plant, *Plantago major* L. *Biologia Plantarum.* 40(3):465-468.

MONTGOMERY, D. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. 3^{ra} Edición. México. Grupo Editorial Iberoamericana.

MURASHIGE, F. and F. SKOOG. 1962. A rised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Phyosiol. Plant.* 15:474-497.

PRAMANIK, S., S. CHAKRABORTY and S. RAYCHAUDHURI. 1995. *In vitro* clonal propagation and characterization of clonal regenerants of *Plantago ovata* Forsk by isozyme analysis. *Cytobios* 82:123-130.

RONSTED, N., H. FRANZYK, J. MOLGAARD, W. JAROSZEWSKI and S. R. JENSEN. 2003. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Syst. Evol.* 242:63-82.

ROUT, G. R., S. SAMANTARAY and P. DAS. 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuana* A. Richard. *Scientia Horticulturae.* 86:71-79.

SAMUELSEN, A. B. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology.* 71:1-21.

**ASPECTOS MORFOANATÓMICOS DE CALLOS
ORIGINADOS DURANTE EL PROCESO
DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
EN BANANO WILLIAMS SUBGRUPO CAVENDISH
(*Musa sp.* GRUPO AAA)**

Jeanetvska Urdaneta González*, Rosanna Valerio,
Teresa Edith Vargas*** y Eva de García******

RESUMEN

Con la finalidad de analizar las características morfoanatómicas de los callos obtenidos durante el proceso de inducción de embriogénesis somática en banano *Musa sp. cv.* "Williams", se cultivaron manos de las posiciones 7^a a la 20^a, provenientes de inflorescencias masculinas inmaduras en medio sólido de inducción de callo MA1. Transcurridos seis meses de cultivo, los callos obtenidos mostraron diferentes morfologías, color y textura y fueron clasificados según su consistencia y color en: compactos blancos nodulares (CCBN), compactos blancos lisos (CCBL), marrones semi-compactos (CMSC) y beige friables (CBgF). Los cortes a mano alzada realizados a estos callos mostraron distintas formas y organizaciones celulares, aunado a la presencia de células embriogénicas en algunos tipos. Después de 15 días de cultivo en medio líquido MA2, todos los callos presentaron células embriogénicas y no embriogénicas en distintas proporciones.

Palabras Clave: Morfoanatomía; callo; banano Williams; embriogénesis somática.

1 Esta investigación ha sido financiada por el FONACIT a través del proyecto G9-7000 700, otorgado a la Dra. Eva de García.

* Ingeniera Agrónoma. Estudiante del Postgrado en Botánica de la Facultad de Ciencias. UCV. Profesora Asistente de la UNESUR. E-mail: jeanetvska@yahoo.com

** Profesora Asistente. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias. Estado Sucre. E-mail: Rosanna_valerio@hotmail.com.

*** Profesoras. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. E-mail: teoriedu@cantve.net / egarcia@reacciun.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

**MORPHOANATOMIC ASPECTS OF CALLUS
ORIGINATED DURING THE INDUCTION PROCESS
OF SOMATIC EMBRYOGENESIS
IN BANANA WILLIAMS, SUBGROUP CAVENDISH
(Musa sp. GROUP AAA)**

Jeanetvska Urdaneta González*, Rosanna Valerio,
Teresa Edith Vargas*** y Eva de García******

SUMMARY

Morphoanatomical characteristics of callus obtained during the induction process of somatic embryogenesis in banana *Musa* sp. cv. "Williams" were analyzed. Hands on positions 7th to 20th coming from immature masculine inflorescences were cultured on a solid media for callus induction (MA1). After 6 months of culture, calli showed different morphologies, color and texture. They were classified by its consistency and color in: nodular white compact callus (NWCC), smooth white compact callus (SWCC), semi-compact brown callus (SCBC) and friable beige callus (CBgF). The histological studies of these calli demonstrated the presence of cells of different shapes, different cellular organization, as well as embryogenic cells. After 15 days of culture in liquid medium MA2, all calli had different proportion of embryogenic and non embryogenic cells.

Key Words: Morphoanatomy; callus; banana Williams; somatic embryogenesis.

1 Esta investigación ha sido financiada por el FONACIT a través del proyecto G9-7000 700, otorgado a la Dra. Eva de García.

* Ingeniera Agrónoma. Estudiante del Postgrado en Botánica de la Facultad de Ciencias. UCV. Profesora Asistente de la UNESUR. E-mail: jeanetvska@yahoo.com

** Profesora Asistente. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias. Estado Sucre. E-mail: Rosanna_valerio@hotmail.com.

*** Profesoras. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. E-mail: teoriedu@cantve.net / egarcia@reacciun.ve

RECIBIDO: febrero 20, 2006.

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos son cultivares cuyas condiciones de esterilidad y altos niveles de ploidía no permiten el fitomejoramiento a través de los métodos convencionales (Grapin *et al.*, 1996, 2000). En este sentido, el uso de técnicas biotecnológicas tradicionales y modernas se ha convertido en una alternativa eficaz para el logro del mejoramiento vegetal.

Entre las técnicas biotecnológicas tradicionales se encuentra la embriogénesis somática, la cual constituye un importante instrumento para el mejoramiento genético vegetal (Grapin *et al.*, 2000). El embrión somático, por su bajo número de células constituyentes, es considerado un material blanco ideal para la transformación genética al aumentar la probabilidad de obtención de plantas uniformemente transformadas (Grapin *et al.*, 1996). La embriogénesis somática en banano ha sido inducida a partir de diferentes materiales vegetales incluyendo flores masculinas inmaduras (Ma, 1991, citado por Grapin *et al.*, 1996, 2000; Escalant *et al.*, 1994).

La mayoría de los estudios realizados incluyen descripciones morfológicas de los callos de *Musa* sp., pero no suministran información acerca de las características anatómicas de los diferentes tipos de callos obtenidos. Dicha información podría aportar datos acerca de la estructura citológica y posible presencia de centros de crecimiento, dentro del tejido calloso, capaces de originar embriones. En este sentido, esta investigación planteó como objetivo analizar las características morfoanatómicas de los callos obtenidos durante el proceso de inducción de embriogénesis somática en banano *Musa* sp. cv. “Williams” a partir de inflorescencias masculinas inmaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: para inducir la callogénesis se utilizaron manos de las posiciones de la 7^{ma} a la 20^{ra} provenientes de flores masculinas inmaduras de banano *Musa* sp cv. “Williams” (grupo AAA), inoculadas en medio MA1 sólido compuesto por sales MS y suplementado con 1 mg l⁻¹ de AIA, 1 mg l⁻¹ de ANA y 4 mg l⁻¹ de 2,4D (Strosse *et al.*, 2003).

Cultivo en medio líquido: Después de seis (6) meses de cultivo de las manos en el medio MA1, los callos obtenidos fueron transferidos a medio

líquido de multiplicación MA2 líquido compuesto por las sales MS y suplementado con 2 mg l⁻¹ de 2,4D (Strosse *et al.*, 2003) y colocados en oscuridad a 27 °C en un agitador rotatorio a 160 rpm.

Estudio histológico: Los diferentes tipos de callos obtenidos durante la inducción fueron fijados en Formol-ácido acético-alcohol (FAA) al 70%, cortados a mano alzada, teñidos con Azul de Astra, y montados para su observación bajo microscopio de luz marca Nikon FX – 35DX con cámara fotográfica incorporada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de seis meses de cultivo en el medio de inducción MA1, los callos obtenidos fueron clasificados según su consistencia y color en: compactos blancos nodulares (CCBN), compactos blancos lisos (CCBL), marrones semi-compactos (CMSC) y beige friables (CBgF).

Los cortes realizados a estos callos mostraron que los CCBN presentaron una estructura celular organizada en las capas externas, apreciándose una epidermis uniestratificada de células dispuestas anticlinalmente a la superficie del callo (Figura A). En algunas zonas de la superficie de estos callos se observaron células de mayor tamaño y abundante contenido citoplasmático, paredes celulares más gruesas, así como la ocurrencia de divisiones celulares internas en todos los sentidos formando masas proembriogénicas (Figura B), estos resultados muestran cierta similitud con los obtenidos por Biberach (1995), quien observó a los seis meses de cultivo que en algunas zonas de los callos compactos se encontraban células sueltas que se desprenden del mismo y que formaban el cultivo embriogénico, caracterizado por la presencia de embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo y en muchos casos estos embriones permanecían unidos a los callos de origen con la pared celular bien delimitada.

Los CCBL presentaron epidermis uniestratificada formada por células pequeñas e isodiamétricas; subepidermis constituida por células organizadas y dispuestas anticlinalmente y una zona interna del callo formada por células isodiamétricas desorganizadas y con pocos espacios intercelulares (Figura C). Los CMSC mostraron una constitución celular más desorganizada con células de poca densidad citoplasmática y espacios intercelulares de mayor tamaño que los anteriores (Figura D). Los CBgF

presentaron una zona central con células organizadas en un tejido relativamente compacto con escasos espacios intercelulares y una zona periférica constituida por células circulares e isodiamétricas de pared delgada y distribución laxa (Figura E).

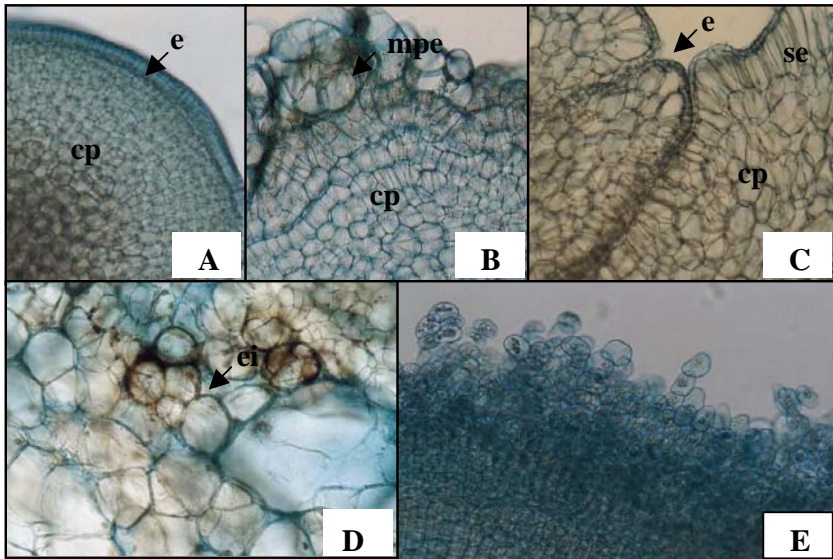


FIGURA. A-B: CCBN; C: CCBL; D: CMSF; E: CBgF. Epidermis (e), subepidermis (se), células parenquimáticas (cp), masas proembriogénicas (mpe), espacios intercelulares (ei).

Biberach (1995), también observó la formación de callos friables a los 3, 4, 5 y 6 meses de cultivos de flores masculinas inmaduras de *Musa* sp., cuyas células ubicadas hacia la periferia de los mismos se desprendían fácilmente y originaron células embriogénicas.

Después de 15 días de transferencia de los callos a medio líquido de multiplicación MA2, las suspensiones celulares obtenidas de los CCBN mostraron abundantes células embriogénicas y no embriogénicas, agregados celulares y embriones, a diferencia de las suspensiones de los CCBL cuyas células fueron escasas y principalmente no embriogénicas.

Las suspensiones de los CMSC mostraron, por su parte, poco crecimiento celular con células embriogénicas y no embriogénicas, mientras que las suspensiones de los CBgF presentaron células embriogénicas, agregados celulares y embriones de color blanco unidos a pequeños fragmentos de callo. Resultados análogos fueron obtenidos por Biberach (1995), a los veinte días de transferir los callos friables al medio líquido, en donde se observó la presencia de agregados celulares embriogénicos y pequeñas células esféricas con citoplasma denso.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios histológicos realizados a callos de *Musa* sp. han sido con la finalidad de observar el origen de los sistemas embriogénicos formados, pero ninguno describe anatómicamente los diferentes tipos de callos originados, haciendo énfasis sólo en aquellos embriogénicos (Escalant *et al.*, 1994; Biberach, 1995; Grapin *et al.*, 1996, 2000; Trujillo y de García 1999; Vidal *et al.*, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

BIBERACH, F. 1995. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* sp. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 86 p.

ESCALANT, J., C. TEISSON and F. CÔTE. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flower of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30:181-186.

GRAPIN, A., J. ORTIZ, T. LESCOT, N. FERRIÈRE and F. CÔTE. 2000. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 61:237-244.

GRAPIN, A., J. SCHWENDIMAN and C. TEISSON. 1996. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32:66-71.

STROSSE, H, R. DOMERGUE, B. PANIS, J. ESCALANT y F. CÔTE. 2003. Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano. Guía técnica INIBAP 8. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.

TRUJILLO, I. and E. de GARCÍA. 1999. Somatic embryogenesis *in vitro* of *musa* clones. Revista Internacional de Botánica Experimental OYTON. 68:7-17.

VIDAL, M, T. VARGAS y E. de GARCÍA. 2000. Estudios anatómicos y morfológicos de la iniciación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices meristemáticos de *Musa* sp. Acta Científica Venezolana. 51:78-83.

ÍNDICE DE AUTORES

ABREU, P.
56(4):585-591

ACEVEDO, M. A.
56(2):151-170
56(4):585-591

AGUILAR, M.
56(4):657-661

ALEJOS, G.
56(3):369-384

ALVA T., S.
56(4):571-576

AMAYA, F.
56(2):253-276

ASCANIO, E.
56(4):485-488

ARNAO T., E. A.
56(4):473-481

ARTIOLI, P. I.
56(1):129-137

BASTIDAS, P.
56(4):485-488; 489-493

BELMONTE, U. C.
56(2):151-170

BERNAL, C.
56(4):555-559

BETANCOURT, C.
56(1):61-74

BETHENCOURT, A.
56(4):485-488; 489-493

BOLÍVAR, A.
56(1):75-109

BRICEÑO, M.
56(4):561-570

BRUCATO, G.
56(4):651-656

CABRERA, P.
56(4):485-488; 489-493

CAMACHO, B.
56(2):183-198

CARDOZO, G.
56(2):183-198

CARRASQUERO DURÁN, A.
56(2):237-252

CASANOVA, E.
56(1):43-60
56(3):325-344; 385-414

CASTRILLO, W. A.
56(2):151-170
56(4):585-591

CHIRINOS, M.
56(4):593-600; 633-641

COLMENARES, J.
56(4):593-600

CONTRERAS, E. J.
56(2):253-276

ÍNDICE DE AUTORES

- DE GOUVEIA, M.
56(1):75-109
- DELGADO, M.
56(2):171-182
- DELGADO, N.
56(4):585-591
- DELGADO, R.
56(3):289-323
- DE LIMA M., N. A.
56(4):663-675
- DÍAZ, T.
56(4):485-488; 489-493
- ESPINOZA, M.
56(3):433-448
- ESPOSITO de D., C. E.
56(4):473-481
- FARÍA, Y. de
56(4):549-554
- FERNÁNDEZ, A.
56(4):485-488; 489-493
- FERNÁNDEZ, H.
56(4):643-650
- FIGUEROA, R.
56(4):585-591
- FINOL, H. J.
56(4):615-620
- GALID, Y.
56(4):577-583
- GALINDO, I.
56(4):555-559
- GAMBOA, C.
56(4):585-591
- GARCIA de, E.
56(4):615-620; 621-626;
687-693; 695-701
- GARCÍA, F.
56(1):61-74
- GASTÓN L., E.
56(3):433-448
- GHNEIM H., T.
56(4):677-686
- GIRALDO V., H.
56(2):253-276
- GONZÁLEZ A., J. A.
56(4):687-693
- GONZÁLEZ, B.
56(4):495-499
- GONZÁLEZ, R.
56(4):495-499
- GRANITO, M.
56(4):513-522; 539-546
- GRAZIANI de FARIÑAS, L.
56(1):5-20
- GUINAND, J.
56(4):513-522
- GUERRA, M.
56(4):539-546
- GUTIÉRREZ, M.
56(1):21-42

ÍNDICE DE AUTORES

HERNÁNDEZ, E.
56(2):253-276

LINARES, N.
56(4):495-499

LÓPEZ, M.
56(1):75-109

MACHADO, D.
56(3):385-414

MADRIZ, P.
56(1):21-42

MAGAÑA L., S.
56(3):433-448

MARCANO, A.
56(4):657-661

MARILYN R., E. A.
56(4):601-606

MARÍN, C.
56(4):643-650

MARTÍNEZ H., R. J.
56(4):473-481

MATA, J.
56(1):61-74; 129-137
56(4):633-641

MATEHUS, J.
56(4):607-613

MEDINA M., A. M.
56(1):129-137
56(4):577-583

MENDOZA, M.
56(4):495-499

MENEST, A.
56(1):111-127

MIJARES, A.
56(4):495-499

MOLINA, G.
56(4):561-570

MOLINA, M.
56(4):473-481; 489-493

MONASTERIO, P.
56(3):369-384

MONTEVERDE, E. E.
56(3):433-448

MONTILLA, R.
56(2):183-198

MORENO, O.
56(4):585-591

NAVAS, M.
56(4):585-591

NOGALES, J.
56(1):5-20

NOGUERA, A.
56(4):593-600; 633-641

OJEDA M., M.
56(2):171-182
56(3):345-368

OROPEZA C., M.
56(4):571-576; 601-606;
621-626; 651-656;
657-661; 663-675;
687-693

ÍNDICE DE AUTORES

- ORTIZ DOMÍNGUEZ, A.
56(2):171-182; 199-218
56(3):345-368
- ORTIZ de BERTORELLI, L.
56(1):5-20
- PERDOMO LEIVA, M. C.
56(4):549-554
- PÉREZ, A.
56(4):663-675
- PÉREZ-ALMEIDA, I.
56(4):549-554; 657-661
- PÉREZ, D.
56(4):513-522; 555-559
- PÉREZ H., G. Y.
56(4):577-583
- PÉREZ, M.
56(4):593-600; 633-641
- PERRONE, T.
56(4):495-499
- PIETERS, A. J.
56(4):677-687
- PINEDA, C.
56(3):385-414
- PIÑA D., G. J.
56(3):433-448
- POLANCO, D.
56(4):633-641
- QUINTERO, A.
56(2):183-198
- RAMÍREZ, F.
56(2):253-276
- RAMÍREZ, M.
56(2):253-276
- RAMÍREZ V., M del C.
56(4):615-620; 627-631
- RAMIS, C.
56(4):549-554
- RAMOS de VEGA, M.
56(4):531-537
- RANGEL, L. A.
56(3):433-448
- REA, R.
56(3):369-384
- REYES, E.
56(4):585-591
- REYES, Y.
56(4):489-493
- REYNA-BELLO, A.
56(4):501-509
- RIVERO, C.
56(1):43-60
56(3):325-344
- RIVERO M., G del C.
56(4):627-631
- RONDÓN, A.
56(2):219-235
- RONDÓN, O.
56(2):219-235

- ROSALES, A.
56(4):677-687
- RUSSIAN L., T.
56(3):415-432
- SALAS, A. M.
56(1):43-60
56(3):289-323
- SALAS, M.
56(1):75-109
- SALAZAR, E.
56(4):585-591
- SALAZAR, M.
56(4):585-591
- SANABRIA de ALBARRACÍN, N.
56(2):219-235
- SANABRIA, N.
56(4):523-529
- SANDREA, Y.
56(1):61-74
- SANGRONIS, E.
56(4):523-529; 531-537
- SANTANA, M. A.
56(4):607-613
- SAN VICENTE, F.
56(4):643-650
- SARMIENTO, A.
56(2):253-276
- SASTRE V., P.
56(1):111-127
- SIFONTES, F.
56(4):489-493
- SIERRALTA, S. L. de
56(4):627-631
- TACORONTE, M.
56(4):561-570
- TAVARES-MARQUES, L.
56(4):501-509
- TORREALBA, D.
56(4):643-650
- TORREALBA, G.
56(4):585-591; 677-686
- TORRES, A.
56(4):523-529
- TORRES, E.
56(4):585-591
- TORRES, O.
56(4):585-591
- TRUJILLO, A.
56(1):21-42
- TRUJILLO D., I. E.
56(4):651-656; 663-675
- URDANETA GONZÁLEZ, J.
56(4):697-703
- VALDIVIESO, E.
56(4):657-661
- VALENZUELA, J.
56(1):21-42
- VALERO, Y.
56(4):539-546

ÍNDICE DE AUTORES

VARGAS, A.
56(2):253-276

VARGAS C., T. E.
56(4):571-576; 601-606
621-656; 687-693; 697-701

VELÁSQUEZ S., R.
56(1):61-74
56(4):593-600; 633-641

VILORIA, J.
56(3):385-414

VIVAS, I.
56(4):489-493

WARNOCK, R.
56(1):21-42

ZAMBRANO, C.
56(2):171-182

ÍNDICE DE TÍTULOS

- α -Galactósidos y fitatos en semilla germinados de *Phaseolus vulgaris* y de *Vigna sinensi*.
56(4):523-529
- Análisis de la estabilidad genética de plantas de *Stylosanthes capitata* Vog., regeneradas “*in vitro*” utilizando marcadores RAPDs.
56(4):663-675
- Análisis de la interacción genotipo-ambiente para rendimiento de maíz en la región maicera del estado Yaracuy, Venezuela.
56(3):369-384
- Aplicación de la proteómica comparativa para la identificación de proteínas en *Phaseolus vulgaris* asociadas a resistencia a plagas.
56(4):555-559
- Área foliar, componentes del área foliar y rendimiento de seis genotipos de caraota.
56(1):21-42
- Aspectos morfoanatómicos de callos originados durante el proceso de embriogénesis somática en banano Williams subgrupo Cavendish (*Musa* sp. Grupo AAA).
56(4):695-701
- Avances en la obtención de huellas moleculares en genotipos de arroz mediante isoenzimas con fines de propiedad intelectual.
56(4):549-554
- Calidad del fruto en accesiones de naranja “Criolla” y “Valencia” en el sector Macanillas – Curimagua, estado Falcón.
56(3):415-432
- Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera.
56(1):5-20
- Comportamiento del cultivo de espárrago verde a diferentes densidades iniciado mediante el sistema tradicional de arañas.
56(1):111-127
- Composición química y nutricional de variedades *Phaseolus vulgaris* cultivadas en Venezuela.
56(4):513-522
- Consideraciones para el desarrollo de un sistema integral de evaluación y manejo de la fertilidad del suelo y aplicación de fertilizantes para una agricultura sustentable en Venezuela.
56(3):289-323
- Cultivo de anteras en dos clones de yuca.
56(4):633-641
- Detección de actividad fosfatasa ácida a partir de callos embriogénicos y no embriogénicos de caña de azúcar.
56(4):657-661

ÍNDICE DE TÍTULOS

- Determinación de la relación genética entre líneas de maíz usando marcadores SSR.
56(4):643-650
- Determinación de niveles de contaminación con plomo en los suelos y polvo de las calles de la ciudad de Maracay.
56(2):237-252
- Diagnóstico de congruencia interna en la percepción de la biotecnología moderna: enfoque micro-político para el caso de Fundación DANAC.
56(4):473-481
- Desarrollo y caracterización de una galleta extendida con caraoas blancas.
56(4):539-546
- Efecto de fuentes alternativas de fertilizantes con el método de la fertirrigación sobre la nutrición mineral y rendimientos de bananos en una finca del estado Aragua, Venezuela.
56(3):325-344
- Efecto de la planta madre en el establecimiento *in vitro* del guanábano.
56(4):627-631
- Efecto del número de embriones por pajueta sobre la viabilidad morfológica post vitrificación en embriones murinos obtenidos *in vivo*.
56(4):489-493
- Efecto de teratógeno de la Aflatoxina B1 sobre embriones murinos.
56(4):485-488
- Evaluación física de tierras de la cuenca alta del Río Guárico con fines de producción sustentable de agua.
56(3):385-414
- Embriogénesis somática en dos especies del género *Plantago* (*Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth).
56(4):687-693
- Embriogénesis somática en Samán.
56(4):593-600
- Establecimiento de un protocolo RAPDs eficiente para plantas de ñame.
56(4):601-606
- Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina.
56(4):501-509
- Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la tripanosomosis animal causada por *Tripanosoma evansi*.
56(4):495-499
- Estudios citogenéticos de estructuras embriogénicas y plántulas regeneradas de onoto.
56(1):129-137

- Evaluación de bioplaguicidas para el manejo del saltahoja verde de la caña de azúcar *Saccharosydne, saccharivora* (Westwood) (Hemiptera: Delphacidae), en el valle San Antonio-Ureña, Táchira, Venezuela.
56(2):253-276
- Evaluación de la calidad molinera y dimensiones de los granos de dos variedades de arroz y sus varietales de arroz maleza.
56(3):345-368
- Evaluación del efecto de diferentes proporciones de granos paddy de varietales de arroz maleza sobre la calidad molinera de variedades de arroz.
56(2):199-218
- Fuente del fósforo absorbido y efectividad agronómica relativa en el maíz en un Ultisol del estado Cojedes, Venezuela.
56(1):43-60
- Identificación de cultivares de arroz con alta capacidad de ajuste osmótico para el mejoramiento genético de la tolerancia a la sequía.
56(4):677-686
- Influencia de la germinación en la composición del *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis*.
56(4):531-537
- Micropropagación de *Lepidium virginicum* L. a partir de microesquejes
56(4):651-656
- Micropropagación de *Musa* spp. (Plátano var. Manzano AAB) a partir de meristemas florales.
56(4):561-570
- Morfogénesis *in vitro* de Dracenas.
56(4):577-583
- Multiplificación *in vitro* de ocumo y taro.
56(4):607-613
- Organogénesis de raíces en geranio.
56(4):571-576
- Origen, evolución y diversidad del arroz.
56(2):151-170
- Parasitismo por *Beauveria bassiana* sobre la broca del café, en el estado Trujillo, Venezuela.
56(2):183-198
- Prácticas conservacionistas y rotación con quinchoncho alternativas sustentables para los agroecosistemas de sabanas de Guárico, Venezuela.
56(1):75-109
- Propagación *in vitro* de *Hippeastrum* sp.
56(4):621-626
- Resistencia de *Rottboellia cochinchinensis* (Lour) W.D. Clayton al herbicida nicosulfuron en cultivo de maíz.
56(2):171-182

Respuesta *in vitro* a la acción de funguicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz en frutos de mango.
56(2):219-235

Ultraestructura de callos embriogénicos y no embriogénicos de banano Williams (AAA, *Musa* spp.).
56(4):615-620

Variación somaclonal en seis genotipos de arroz.
56(4):585-591

ÍNDICE DE MATERIAS

α -Galactósidos
* Alfa galactosidasa
56(4):523-529

Accesiones
* Calidad
56(3):415-432

Aceptabilidad
* Calidad
56(4):539-546

ADN
56(4):601-606; 663-675

Aflatoxina
* Aflatoxinas
56(4):485-488

Agua
56(3):385-414

Ajuste osmótico
* Osmosis
56(4):657-661

Albizia saman
56(4):593-600

AMMI
56(3):369-384

Anaplasma marginale
56(4):501-509

Anaplasmosis bovina
* Anaplasmosis
56(4):501-509

Anaplasmosis ovina
* Anaplasmosis
56(4):501-509

Annona muricata L.
56(4):627-631

Anteras
* Cultivo de anteras
56(4):633-641

Antracnosis
56(2)219-235

Aptitudes de la tierra
* Vocación de la tierra
56(3):385-414

Aragua
56(3):325-344

Arcelinas
* Lectinas
56(4):555-559

Área foliar
* Hojas
56(1):21-42

Arroz
* *Oryza*
56(4):585-591; 657-661

Asparagus officinalis
* *Asparagus officinalis*
56(1):111-127

Bananos
* *Musa* (bananos)
56(3):325-344

ÍNDICE DE MATERIAS

Banano William
56(4):695-701

Beaveria bassiana
* *Beauveria bassiana*
56(2):183-198; 253-276

Bioplaguicidas
56(2):253-276

Biotecnología moderna
* Biotecnología
56(4):473-481

Biotipo
* Biotipos
56(2):171-182

Bixa orellana L.
56(1):129-137

Broca del café
* *Hypothenemus hampei*
56(2):183-198

Cajanus cajan (L.)
56(1):75-109

Calidad
56(3):415-432; 433-448

Calidad molinera
* Calidad
56(2):199-218
56(3):345-368

Callos
* Callo
56(1):61-74;
56(4):571-576; 695-701

Caña de azúcar
* *Saccharum officinarum*
56(2):253-276
56(4):677-687

Características químicas
* Propiedades fisicoquímicas
56(1):5-20

Caraota
* Frijol (*Phaseolus*)
56(1):21-42
56(4):513-522; 523-529
539-600; 555-559

Chysoperla externa
56(2):253-276

Ciclo de nutrimentos
* Nutrientes
56(3):289-323

Citrus latifolia tan
* *Citrus aurantiifolia*
56(3):433-448

Citrus sisnensis obs.
* *Citrus sinensis*
56(3):415-432

Cochinchinensis
56(2):171-182

Colletotrichum
56(2):219-235

Colocasia esculenta
56(4):607-613

Componentes del área foliar
* Hojas
56(1):21-42; 129-137

Composición
* Composición aproximada
56(4):513-522

Composición química
56(4):539-546

ÍNDICE DE MATERIAS

- Conservación
* Conservación de suelos
56(3):385-414
- Contaminación
56(2):237-252
- Control biológico
56(2):183-198
- Coronas
56(1):111-127
- Cotiledones Millsp
* Cotiledones
56(1):61-74
- Cuenca alta del Río Guárico
* Cuencas hidrografica
56(3):385-414
- Cultivo *in vitro*
56(4):571-576; 577-583;
607-613; 621-626;
651-656; 663-675
- D-Sativa*
56(3):345-368
- Diagnóstico
56(4):495-499
- Digestión ácida
* Digestón
56(4):237-252
- Dioscorea alata*
56(4):601-606
- Diversidad
* Biodiversidad
56(2):151-170
- Dracena sanderiana*
56(4):577-583
- Eficiencia productiva
* Productividad
56(3):433-448
- Embriogenesis somática
56(4):593-600; 615-620;
677-687; 695-701
- Embrión
56(4):485-488; 489-493
- Embriones somáticos
* Embrión somático
56(1):61-74
56(4):687-693
- Entomopatogenos
* Hongos entomopatogenos
56(2):183-198
- Estabilidad
56(3):369-384
- Estabilidad genética
56(4):663-675
- Estaminodios
56(1):61-74
- Fedearroz 50
56(3):345-368
- Fertilidad del suelo
56(3):289-323
- Fertirrigación
56(3):325-344
- Fertilización
* Aplicación de abonos
56(3):289-323

ÍNDICE DE MATERIAS

- Fertilizantes fosfatados parcialmente solubles
* Abonos fosfatados
56(1):43-60
- FONAIAP 2000
56(4):657-661
- Fruto
56(3):415-432
- Fosfatasa ácida
56(4):677-686
- Funguicidas
56(2):219-235
- Galletas
56(4):539-546
- Germinación
56(4):531-537
- Germoplasma
56(3):415-432
- Germoplasma exótico
* Germoplasma
56(2):151-170
- Gestión comunicacional
* Gestión
56(4):473-481
- Gloeosporioides penz*
* *Gloeosporium*
56(2):219-235
- Grupos heteróticos
56(4):643-650
- Haden
56(2):219-235
- Haploide
* Haploidia
56(1):129-137
56(4):633-641
- Hippeastrum*
56(4):621-626
- Hypothenemus hampei ferrari*
Hypothenemus hampei
56(2):183-198
- Índices de área foliar
* Hojas
56(1):21-42
- Índices físicos
56(1):5-20
- Inflorescencia
* Inflorescencias
56(4):561-570
- Inositol fosfatos
* Inositol
56(4):523-529
- Interacción GxA
56(3):369-384
- Izoenzimas
* Isoenzimas
56(4):549-554
- Llantén
* Flores
56(4):687-693
- Lectinas
56(4):555-559
- Leguminosas
56(4):531-537; 663-675

- Lepidium* sp.
56(4):651-656
- Maíz
* *Zea mays*
56(3):369-384
56(4):643-650
- Manejo conservacionista
* Conservación de los recursos
56(1):75-109
- Manejo integrado de plagas
* Gestión de lucha integrada
56(2):183-198
- Mangifera indica* L.
* Mango
56(2):219-235
- Mango
* *Mangifera indica* L
56(2):219-235
- Manihot esculenta*
* Mandioca
** Yuca
56(4):633-641
- Maracay
* Aragua
56(2):237-252
- Marcadores moleculares
* Marcadores genéticos
56(4):549-554
- Marco de plantación
56(1):111-127
- Medicinal
* Plantas medicinales
56(4):687-693
- Mejoramiento genético
* Mejora genética
56(4):657-661
- Metarhizium anisopliae*
56(2):253-276
- Mezcla RFR+SFT
56(1):43-60
- Microesquejes
* Esquejes
56(4):651-656
- Micropropagación
56(4):607-613; 621-626; 627-631
- Minerales
56(4):531-537
- Modelos multiplicativos
* Modelos
56(3):369-384
- Morfoanatomía
* Anatomía animal
56(4):695-701
- Morfogénesis
56(4):577-583
- Murinos
56(4):485-488; 489-493
- Musa*
56(4):561-570
- Musa paradisiaca* L.
56(3):325-344
- Musa* spp
56(4):615-620

ÍNDICE DE MATERIAS

Naranja “Criolla”

- * *Citrus sinensis*
56(3):415-432

Origen

- * Procedencia
56(2):151-170

Oryza sativa L.

- * Arroz
56(2):151-170; 199-218
56(3):345-368
56(4):549-554; 585-591

Patrones

56(3):433-448

PCR

56(4):495-499; 501-509

Pelargonium peltatum

56(4):571-576

Percepción pública de investigadores DANAC

- * Científicos
56(4):473-481

Phaseolus Vigna

- * *Phaseolus*
56(4):523-529

Phaseolus vulgaris

56(1):21-42
56(4):513-522; 539-546; 555-559

Planta donante

- * Donantes
56(4):627-631

Platanos

- * *Musa* (platanos)
56(4):561-570

Plomo

56(2):237-252

Polvo de las calles

- * Polvo (contaminantes)
56(2):237-252

Primordios

- * Brotes
56(4):561-570

Proporción mezcla Paddy

56(2):199-218

Proteómica

56(4):555-559

Química nutricional

- * Composición química
** Nutrientes
56(4):513-522

QTLs

56(4):657-661

Raíces

56(4):571-576

RAPDS

- * RAPD
56(4):585-591; 601-606

Rendimiento

56(1):21-42

Resistencia

56(2):171-182

Resistencia a plagas

56(4):555-559

Roca fosfórica riecito (RFR)

- * Roca
56(1):43-60

ÍNDICE DE MATERIAS

- Rottboellia*
56(2):171-182
- Saccharosydne saccharivora*
56(2):253-276
- Saccharum* spp.
56(2):253-276
- Secado
56(1):5-20
- Sistema de inicio
56(1):111-127
- Somaclón
* Variación genética
56(4):585-591
- SSR
56(4):643-650
- Suelos
* Suelos Agrícolas
56(2): 237-252
- Suelos ácidos
* Suelo ácido
56(1):75-109
- Superfosfato triple (SFT)
* Superfosfato
56(1):43-60
- Sustentabilidad
* Sostenibilidad
56(1):75-109
56(3):289-323
- Tahití
* Polinesia francesa
56(3):433-448
- Taxonomía
56(2):151-170
- TDZ
56(4):593-600
- Técnicas isotópicas (32p)
* Tecnicas de trazadores
56(1):43-60
- Theobroma cacao* L.
56(1):5-20; 61-74
- Tiosulfato de amonio
56(3):325-344
- Tiosulfato de potasio
56(3):325-344
- Tipos de utilización de las tierras
* Utilización de la tierra
56(3):385-414
- Tolerancia a la sequía
* Resistencia a la sequía
56(4):657-661
- Tommy Atkins
56(2):219-235
- Trigo
56(4):539-546
- Tripanosoma evansi*
* Phytomonas
56(4):495-499
- Ultraestructura
56(4):615-620
- Valencia
Carabobo
56(3):415-432

ÍNDICE DE MATERIAS

Variedades
56(2):199-218

Varietales arroz maleza

* Arroz

** Variedades

56(2):199-218

56(3):345-368

Venezuela

56(3):325-344

Vitrificación
56(4):485-498

Xanthosoma sagittifolium

56(4):607-613

Zea mays L.

* Maíz

56(2):171-182

56(3):369-384

56(4):643-650

AGRONOMÍA TROPICAL

REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS VENEZUELA

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Agronomía Tropical publica trabajos originales producto de la investigación en el área de la agronomía. Se reconocen por trabajos originales aquellos que son producto de la investigación o experimentación, que tienen como objetivo concreto desarrollar nuevos conceptos o tecnologías y adaptar las existentes a las condiciones locales.

El envío de trabajos a **Agronomía Tropical** implica que no han sido presentados para su publicación en otra revista.

Los trabajos cortos, que describen técnicas experimentales, equipos, fenómenos naturales, o especies nuevas, serán publicados en la revista como notas. También se aceptan reseñas de libros recientemente publicados.

Manuscritos

Se requieren un original y tres copias legibles, mecanografiadas a doble espacio en papel blanco tamaño carta (28,0 x 21,5 cm), utilizando una sola cara con márgenes de 2 cm en la parte superior y 3 cm en los demás lados. Las páginas deben ser numeradas consecutivamente. La versión final del trabajo, en la cual se han acogido las observaciones de los revisores, deberá remitirse tanto en un original mecanografiado, como archivado en un CD o disquette transcrito en MS Word 6,0 o superiores.

La secuencia en la presentación de un trabajo es como sigue: título, autor(es), palabras clave, resumen, introducción la cual debe incluir la revisión de literatura, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones (si las hubiere), resumen (summary) y título en inglés, agradecimiento (si hubiere), bibliografía.

Los títulos de cada una de las partes del trabajo deben insertarse en el texto en letras mayúsculas y en el centro de la página.

La extensión del trabajo no debe exceder de 25 páginas a doble espacio, incluyendo en ellos cuadros, figuras y referencias.

Título. Escrito en letras mayúsculas, debe ser claro y conciso, procurando no excederse de 20 palabras. Debe identificar y describir concretamente el contenido del trabajo, sin abreviaturas. Sólo deben incluirse los nombres comunes de plantas, insectos, etc., cuando se requiere, dejando como palabra clave el nombre científico de los mismos.

Autor(es). Primer nombre completo, inicial del 2^{do} y apellidos completos. Después de los nombres se usarán asteriscos para identificar al pie de página el cargo, la institución y dirección postal donde trabajan. Debe usar el nombre completo de la institución con la abreviatura o sigla entre paréntesis. Al pie de página puede identificarse, si es necesario, la institución que financió el trabajo, o si es parte de una tesis de grado.

Resumen. Debe tener un máximo de 250 palabras (150 para las notas), en un sólo párrafo. Específicamente debe exponer cuál es el objetivo del trabajo, cómo se realizó, los resultados cuantitativos más relevantes, porqué son relevantes, y la conclusión. Los entes biológicos y los suelos deben ser identificados por sus nombres científicos cuando son mencionados por primera vez en el resumen y en el summary y la primera vez que aparezcan en el cuerpo del trabajo, tanto en castellano como inglés, y no deben repetirse en el cuerpo del artículo.

Palabras Clave. Son aquellas que permiten identificar el tópico que se discute en el texto y que faciliten la elaboración del índice de materias, tratando de no repetir las que se usen en el título. Debe incluir los nombres científicos de los entes biológicos.

Introducción. Debe estar formada por una breve referencia de los antecedentes que motivaron a la realización del trabajo; igualmente debe incluir la revisión de literatura con las investigaciones más recientes que aporten ideas fundamentales para la realización del trabajo. También incluirá el objetivo del mismo. Para las referencias bibliográficas se usará el sistema de apellidos del primer autor y el año de publicación.

Materiales y Métodos. La presentación debe ser clara y concreta, siguiendo un ordenamiento lógico de las técnicas empleadas en la investigación y los materiales utilizados. Los procedimientos analíticos y estadísticos usados deben ser descritos claramente o citados como referencias bibliográficas.

Resultados y Discusión. Esta sección debe satisfacer los objetivos que se señalaron en la introducción, manejando la información cuantitativa a través de cuadros o figuras a fin de transmitir en forma clara el significado de los resultados obtenidos. Es necesario el uso de la estadística para verificar la validez de los resultados, cuando así se requiera. La discusión de los datos deberá hacerse basada en los soportes disponibles en la literatura.

Agradecimiento. Se utilizarán para reconocer a aquellas personas que han hecho contribuciones sustanciales al trabajo o han prestado asistencia técnica. Igualmente para reconocer a las instituciones que han brindado apoyo financiero a la investigación.

Cuadros. Cada cuadro se presentará en hoja separada, colocada a continuación del texto donde se haga alusión a él por primera vez, y seguirán la paginación del texto. El contenido de los cuadros no debe ser duplicado en las figuras. Los asterísticos se usarán para mostrar el nivel de significancia estadística de 0,05 (*), 0,01 (**), y 0,001 (***) ; los asteriscos deben ir acompañados del nombre de la prueba estadística realizada. Para otras llamadas deberán utilizarse otros símbolos. El título del cuadro debe ser concreto y expresar el contenido del mismo.

Figuras. Se entiende por figura cualquier ilustración que se incluya en el trabajo (gráficos, dibujos, fotografías, esquemas, mapas). Estas no deben ser una duplicación de la información de los cuadros. Las figuras pueden dibujarse a mano alzada con tinta china en papel albanene, o elaboradas con un software y reproducidas en impresora láser. De ser posible, use figuras de 1/2 página (9 x 11 cm). No es deseable usar letras mayúsculas en el título el cual debe colocarse en la parte inferior de la figura.

En caso de usar fotografías, las leyendas se describirán en hoja aparte, con el respectivo número de la figura. Se requieren los negativos o diapositivas, marcadas por detrás con lápiz suave, con el número de la figura y el título del artículo.

Para las fotografías y otros dibujos digitalizados, los mismos deberán procesarse en formato TIFF (cmyk). En cuanto a los gráficos (líneas, barras, tortas...) se recomienda utilizar Harward Graphic o Excel, adjuntando la información con la cual se elabora la figura, de tal manera que cuando se requiere pueda ser modificada en la oficina de edición de la revista. No use innecesariamente gráficos tridimensionales.

Debe evitar el uso del color en los gráficos y demás figuras, ya que esto encarece la edición de la revista. De requerirse el uso del color en las fotografías, agrúpelas y numérelas secuencialmente.

Bibliografía. Sólo deben ser incluidas publicaciones que estén disponibles en las bibliotecas; las comunicaciones personales serán citadas en el texto al pie de página indicando el nombre completo y la dirección del autor de la comunicación, el año en que se produjo. Las citas bibliográficas deben ser ordenadas alfabéticamente siguiendo el siguiente esquema:

- Artículos de revistas: autor(es), colocar el apellido del primer autor y luego la inicial del nombre, para los otros autores, primero la inicial del nombre y luego el apellido (en mayúscula); año de la publicación; título del artículo; abreviatura del nombre de la revista; volumen; página inicial y final del artículo.

- Libros y folletos: autor(es), año de la publicación, título, editor o traductor, número de la edición, lugar de la publicación (ciudad), casa editorial, paginación y serie.
- Artículos en una publicación colectiva: autor(es), año de la publicación, título del artículo, preposición latina **In** subrayada o en negrita, y seguida de dos puntos (:) y luego la referencia completa del libro.
- Tesis: autor, año, título, la palabra tesis, el grado académico en forma abreviada y en el mismo idioma en que está redactada la tesis, ciudad, país, universidad, facultad y número de páginas.

Dos o más artículos del mismo autor(es) deben ser ordenados cronológicamente, en caso de ser del mismo año debe usarse letras minúsculas a, b, c, d, etc.

Revisión de los Manuscritos. La revista garantiza la confidencialidad en el proceso de revisión de los trabajos por parte de especialistas reconocidos.

Estilo.

Los entes biológicos deben ser identificados por sus nombres científicos completos (binomial) en el título (cuando se requiera así como en el resumen, summary y la primera vez que se mencionan en el cuerpo de trabajo.

Los nombres de productos comerciales deben evitarse, prefiriéndose el nombre genérico. Cuando ello sea posible utilícelo seguido del símbolo®.

Los nombres de las variedades, cultivares e híbridos deberán acompañarse de virgulillas o comillas simples sólo cuando se mencionen por primera vez en el resumen, en el summary y en el cuerpo del artículo.

Los suelos deben ser identificados taxonómicamente; si el nombre de la serie no es muy conocido deberá señalarse la familia.

Los símbolos no tienen plural ni llevan punto (.) después de ellos, y sólo se escriben en mayúsculas aquellos derivados de nombre propios Celsius, Kelvin, Joule.

Los decimales deben separarse con coma (,) y no con punto (.). Las unidades de mil o millón se indicarán con un espacio en blanco.

La abreviatura correspondiente a Agronomía Tropical es Agronomía Trop.

Para más detalles de estilo y presentación obsérvese los últimos números de la revista.

Los símbolos a usar son:

Símbolo/abrev,	reemplaza	
metro,	m,	
kilómetro,	km (10^3 m)	
decímetro,	dm	
centímetro,	cm (10^{-2} m)	
milímetro,	mm (10^{-3} m)	
micra	m	
micromilímetro,	mm (10^{-6} m),	microm
nanómetro,	nm (10^{-9} m),	Angstrom
metro cuadrado,	m ²	
hectárea,	ha	
metro cúbico,	m ³	
litro,	l	
gramo,	g	
kilogramo,	kg	
tonelada,	t	
mega gramo,	Mg,	
miligramo,	mg (10^{-3} g)	
microgramo,	µg (10^{-6} g)	
nanogramo,	ng (10^{-9} g)	
kilogramo/hectárea,	kg ha ⁻¹	
toneladas/hectárea,	t ha ⁻¹	
megapascal,	M Pa,	bar
grado Celsius,	°C	
grado Joule,	J,	caloría
grado Kelvin	°K	
centímole por kilogramo,	c mol kg ⁻¹ ,	meq por 100g
gramo por kilogramo,	g kg ⁻¹	
miligramo por kilogramo,	mg kg ⁻¹ ,	ppm
metro sobre el nivel del mar	m.s.n.m.	

La revista proporcionará gratis a los autores 25 separatas de sus trabajos.

Para reproducir un material o parte de él, deberá obtenerse el permiso de la revista.

Los manuscritos deben ser enviados al Editor de **Agronomía Tropical**, INIA, Apdo. 2103, Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela, acompañados de una comunicación en la cual se señale el autor a quién deberá dirigirse la correspondencia, su dirección, teléfonos de oficina y domicilio y la firma de cada uno de los autores del trabajo.

Composición: Carmen Elena Solórzano
Montaje: Nury Castillo
Fotolito: Mario Pino
Impresión: Eliseo Ureña y Juan Salas

Impreso en el Taller Gráfico del INIA
Maracay, estado Aragua, Venezuela
Mayo 2007

