

DISCRIMINACIÓN DE GRUPOS DE PLOIDÍA EN CAFÉ MEDIANTE EL ANÁLISIS MULTIVARIADO DE INDICADORES MORFOLÓGICOS INDIRECTOS

Juan Carlos Herrera-Pinilla *; Germán Moreno-Ruiz *; Bernardo Chaves-Córdoba.**

RESUMEN

HERRERA P., J.C.; MORENO R., G.; CHAVES C., B. Discriminación de grupos de ploidía en café mediante el análisis multivariado de indicadores morfológicos indirectos. *Cenicafé* 51(3):207-215. 2000.

Se estudió la variación cuantitativa en cinco características morfológicas relacionadas con las hojas del cafeto (densidad de estomas, longitud de las células guardas, número de plastidios estomáticos, relación largo/ancho de la hoja y área foliar) en *Coffea arabica*, *C. canephora* y sus híbridos respectivos. El índice foliar (relación largo/ancho) no fue una característica adecuada para discriminar entre plantas con diferentes niveles de ploidía. El análisis multivariado de los datos utilizando la técnica de componentes principales y la clasificación jerárquica ascendente, mostró que la combinación: densidad estomática - longitud de las células guardas - número de plastidios estomáticos y área foliar, permitió hacer una clara discriminación entre los grupos de ploidía preestablecidos (2X, 3X, 4X), respecto al análisis univariado de estas mismas características. Se propone la aplicación de este tipo de análisis en la discriminación de genotipos de café de diferente origen.

Palabras claves: Café, *Coffea* sp., análisis multivariado, morfología, número de cromosomas, ploidía.

ABSTRACT

Quantitative variation of five characteristics related to leaves (stomatal density, length of guard cells, number of chloroplasts in guard cells, leaf length/width ratio, and leaf area) were studied in plants of *Coffea arabica* and *C. canephora*, and their respective hybrids. Leaf length/width ratio was not a good characteristic to distinguish plants of different ploidy. Multivariate analysis using principal components and hierarchical classification showed that the combination stomatal density – length of guard cells – number of chloroplasts in guard cells – leaf area, allows a clear discrimination of selected ploidy groups (2X, 3X, and 4X), with respect to the univariate analysis of these same characteristics. Application of this methodology in order to separate genotypes of different ploidy levels is proposed.

Keywords: Multivariate analysis, coffee, morphology, chromosome number, ploidy.

* Asistente de Investigación e Investigador Principal I, respectivamente. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

** Investigador Científico II. Biometría. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

Cuando se regeneran plántulas a partir del cultivo de tejidos de origen somático o gamético, frecuentemente ocurren variaciones en el número y estructura de los cromosomas, que se manifiestan en cambios fenotípicos, muchas veces no deseados por el mejorador de plantas. Resulta entonces importante determinar el número cromosómico de estas plantas, con el fin de establecer el tipo y grado de variación que se está induciendo a partir de la manipulación *in vitro*. La determinación del nivel de ploidía en plántulas de café regeneradas por métodos *in vitro* (p. ej. explantes foliares, anteras o granos de polen) es una tarea difícil en la mayoría de los casos, dado el número y tamaño de los cromosomas. Además, esta metodología resulta muy tediosa cuando se trata de evaluar un alto número de plantas, como es de esperar, con miras a su utilización en un programa de mejoramiento genético.

El uso de características morfológicas relacionadas con el número de cromosomas es una alternativa interesante ya que es fácil de aplicar y permite discriminar niveles de ploidía intra e interespecíficos. Esta metodología ha tenido importantes aplicaciones en cultivos como el clavel (7), el algodón (4), el maíz (6) y el pepino (11), entre otros.

En café se han utilizado algunas de estas características morfológicas para diferenciar materiales de *Coffea arabica* y *C. canephora* de origen híbrido o del producto de la duplicación con colchicina (3, 8, 9, 15). Caracteres tales como la densidad estomática, el número de plastidios estomáticos ó el índice foliar, han servido para separar grupos de ploidía de diferente origen. Sreenivasan *et al.* (13), determinaron que la densidad de estomas y el número de cloroplastos estomáticos son los caracteres que permiten mejor discriminación de grupos de ploidía en diferentes materiales de café; sin embargo, el uso individual de una u otra característica sigue siendo poco confiable para algunos investigadores.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad discriminante que tienen algunos de estos indicadores morfológicos en el café, al ser analizados en forma conjunta mediante técnicas de análisis multivariado. Estos resultados fueron comparados con la discriminación hecha a partir del análisis individual (univariado) de cada una de estas características.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se formaron tres grupos de ploidía compuestos de árboles de las especies *C. canephora* (genotipos diploides), *C. arabica* (genotipos tetraploides) y sus híbridos respectivos (genotipos triploides). Los materiales estudiados se tomaron del banco de germoplasma ubicado en Cenicafé, en la Estación Central "Naranjal" en Chinchiná, Caldas. En la Tabla 1 se presentan los tres grupos de genotipos estudiados.

Variables evaluadas. De cada genotipo seleccionado se tomaron tres árboles a los cuales se les midieron las siguientes características:

Densidad de estomas (DENEST), determinada como el número de estomas por milímetro cuadrado de lámina foliar, a partir de 10 campos por hoja y 5 hojas por árbol.

Longitud de las células estomáticas (LONGCEL), tomada en 20 células por hoja y 5 hojas por árbol;

Número de cloroplastos en las células acompañantes (CLORCEL), medido en 20 células acompañantes - 10 estomas - por hoja y en 5 hojas por árbol. El recuento de cloroplastos se hizo aprovechando su autofluorescencia bajo la luz ultravioleta

Índice foliar (L/A) y (v) Área foliar (AREAFOL), determinados para 20 hojas por

TABLA 1. Lista de genotipos seleccionados para conformar los diferentes grupos de ploidía estudiados.

Grupo de ploidía	Número Genotipos de Cromosomas		Identificación
Diploides	2X = 22	<i>Coffea canephora</i> var Robusta (EA 228) <i>C. canephora</i> var. Laurentii (EA 287) <i>C. canephora</i> (EA 179)	CAN 1 CAN 2 CAN 3
Triploides ^{1/}	3X = 33	Caturra X <i>C. canephora</i> (Híbrido N?4153) Caturra X <i>C. canephora</i> (Híbrido N?4154) Caturra X <i>C. canephora</i> (Híbrido N? 159)	HIB 1 HIB 2 HIB 3
Tetraploides	4X = 44	<i>Coffea arabica</i> var. Caturra <i>C. arabica</i> var. Colombia (Progenie 1) ^{2/} <i>C. arabica</i> var. Colombia (progenie 2) ^{2/}	CAT VCP1 VCP2

1/ Híbridos F1 derivados del cruce entre var. Caturra X *C. canephora*.

2/ Materiales F5 derivados del cruce de var. Caturra X Híbrido de Timor.

árbol, tomadas del segundo y tercer par en ramas del tercio medio.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis univariado para cada una de las características medidas, utilizando un arreglo anidado bajo una disposición aleatoria. Se tomaron los grupos de ploidía como factores principales, dentro de los cuales estaban los genotipos respectivos representados a su vez por los árboles individuales.

Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinar la importancia de cada una de las variables discriminantes, las cuales una vez seleccionadas, se utilizaron para elaborar un agrupamiento de los diferentes genotipos por similitud (Análisis Cluster). Lo anterior, con el fin de establecer la eficiencia discriminadora del conjunto de variables con respecto a los grupos de ploidía preestablecidos. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS. (12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis univariado. En la Tabla 2 se presentan los promedios de los valores y la variación

observada para cada una de las características evaluadas en los distintos genotipos y grupos de ploidía. El carácter DENEST presentó la mayor variación con porcentajes relativamente altos en los tres grupos de ploidía (8,1; 11,4 y 14,8% para triploides, tetraploides y diploides, respectivamente). La mayor variación observada en los genotipos diploides de *C. canephora* puede explicarse principalmente por su carácter alógamo, que los hace genéticamente más diversos.

Tal como puede apreciarse en la Tabla 2, no todas las características medidas presentaron una relación directa con el nivel de ploidía de las plantas. Así, mientras las variables LONGCEL y CLORCEL mostraron una relación directa con el número de cromosomas, las variables DENEST y AREAFOL revelaron una relación inversa. El carácter L/A por su parte, no mostró una tendencia definida al respecto. Tales relaciones coinciden con lo registrado por otros investigadores quienes usaron este tipo de índices indirectos para separar materiales de diferente origen (5, 8, 9, 13).

El análisis de varianza (Tabla 3) estableció diferencias significativas entre los distintos grupos de ploidía ($P < 0,01$) para las cinco caracte-

TABLA 2. Promedio, coeficientes de variación y límites de confianza obtenidos para las variables morfológicas evaluadas dentro de cada grupo de ploidía.

Grupos de Ploidía	ÍNDICES MORFOLÓGICOS EVALUADOS				
	DENEST	LONGCEL	CLORCEL	L/A HOJA	AREAFOL
DIPLOIDES	331,23 a* (14,8 %) ^{1/} 291,2 - 371,2 ^{2/}	21,21b (7,5 %)	10,74 c (5,6 %)	2,23 b (4,5 %)	89,42a (5,9 %)
TRIPLOIDES	258,24 ab (8,1 %)	24,60 a (4,1 %)	13,36 b (3,0 %)	2,47 a (4,0 %)	69,72 b (4,6 %)
	241,2 - 275,3	23,8 - 25,4	13,0 - 13,7	2,4 - 2,5	67,1 - 72,3
TETRAPLOIDES	174,77 b (11,4 %)	26,02 a (2,3 %)	15,09 a (4,6 %)	2,36 ab (4,2 %)	53,14 c (5,6 %)
	158,5-191,0	25,6-26,4	14,5-15,6	2,3-2,4	50,7-55,5

DENEST: densidad de estomas; LONGCEL: longitud de las células acompañantes del estoma; CLORCEL: número de cloroplastos en las células acompañantes; L/A HOJA: índice largo/ancho de la hoja; AREAFOL: área foliar.

* Para una misma variable, los promedios con igual letra son estadísticamente iguales ($P < 0,05$), según la prueba de diferencias mínimas significativas (DMS).

1/ Coeficientes de variación (%).

2/ Límite de confianza al 95% ($P < 0,05$)

TABLA 3. Valores de F derivados del análisis de varianza realizado para cada una de las cinco variables morfológicas medidas para los diferentes grupos de ploidía.

Fuente de variación	DENEST	LONGCEL	CLORCEL	L/A	AREAFOL
Entre grupos	16,85**	25,44**	64,40**	5,5**	127,6 **
Dentro de grupos	6,19**	1,98ns	2,8*	5,2**	1,5 ns

*, ** Significativo al 0,05 y 0,01 de probabilidad, respectivamente.

ns No significativo

rísticas estudiadas, lo que demuestra que tales variables poseen capacidad para separar por lo menos dos de los grupos de ploidía pre-establecidos. Por otro lado, mientras los grupos de ploidía discriminados por las variables LONGCEL y AREAFOL fueron bastante homogéneos, la variación dentro de grupos para las demás características fue significativamente mayor (Tabla 3).

Solamente las variables CLORCEL y AREAFOL permitieron discriminar entre los tres grupos de ploidía (Tabla 2). Las demás

variables fueron incapaces de separar los genotipos triploides (como en el caso de las variables DENEST y LONGCEL), o los tetraploides (caso de la variable L/A). Estos resultados difieren de los encontrados por Sreenivasan *et al.* (13), quienes proponen la variable DENEST como un carácter eficiente para la discriminación de grupos de ploidía en café. Lo anterior muestra que el análisis individual de algunas de estas características puede llevar a clasificar genotipos dentro de grupos de ploidía erróneos, no permitiendo entonces hacer una separación confiable.

Análisis multivariado. El análisis previo de la matriz de correlación entre las diferentes características medidas (Tabla 4) muestra que las variables DENEST, CLORCEL, LONGCEL y AREAFOL se hallan estrechamente correlacionadas, mientras que la variable L/A presenta coeficientes más bajos que están indicando un grado menor de asociación con las demás variables evaluadas.

Al realizar el ACP se logra obtener el resumen descriptivo de un conjunto de datos originados a partir de un número determinado de variables continuas. Al final, es posible entonces determinar la importancia de cada variable para explicar la varianza total, gracias a la conformación de vectores propios (factores) formados a partir de la combinación lineal de las variables

originales. En la Tabla 5 se presentan los valores propios y la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales generados por el ACP. Se observa que con los dos primeros componentes es posible explicar el 91,04% de la variación total, pudiéndose reducir el problema de cinco a dos factores con una pérdida mínima de información original (8,06%).

Al analizar la correlación existente entre cada variable y los ejes principales (Tabla 6), es clara la importancia de cuatro variables en la explicación del primer eje (DENEST, LONGCEL, CLORCEL y AREAFOL), así como la influencia de una (L/A) sobre el segundo eje. Los coeficientes de determinación respectivos dan una idea de la importancia de cada variable dentro del análisis.

TABLA 4. Matriz de valores de correlación entre las diferentes variables morfológicas evaluadas.

	DENEST	LONGCEL	CLORCEL	L/A	AREAFOL
DENEST	1,0000	-0,6489**	-0,8652**	-0,2517ns	0,8748**
LONGCEL		1,0000<	0,8119**	0,5294**	-0,8247**
CLORCEL			1,0000	0,3605ns	-0,9025**
L/A				1,0000	-0,4223 *
AREAFOL					1,0000

*, ** Significativo al 0,05 y 0,01 de probabilidad, respectivamente.

ns No significativo

TABLA 5. Valores propios de la matriz de correlación y varianza explicada, resultantes del ACP realizado para las diferentes características morfológicas evaluadas.

Componente No	Valor Propio	Varianza Total Explicada	
		% Absoluto	% Acumulado
1	3,6955	0,7391	0,7391
2	0,8564	0,1713	0,9104
3	0,2754	0,0551	0,9655
4	0,0977	0,0195	0,9850
5	0,0749	0,0150	1,0000

TABLA 6. Valores de correlación (r) y coeficientes de determinación (R^2) para las cinco variables morfológicas consideradas respecto a los dos ejes o factores principales seleccionados por el ACP.

VARIABLE	EJE 1		EJE 2	
	r	R^2	r	R^2
DENEST	- 0,8826	0,7789	0,3335	0,1112
LONGCEL	0,8975	0,8055	0,1494	0,0223
CLORCEL	0,9475	0,8977	-0,1800	0,0324
L/A	0,5361	0,2874	0,8230	0,6773
AREAFOL	- 0,9623	0,9260	0,1147	0,0132

Dada la alta correlación entre las variables que explican el primer eje y la mínima discriminación lograda por la variable L/A respecto a los tres grupos de ploidía, se decidió excluir ésta última del análisis y realizar un nuevo ACP con las cuatro variables restantes. Los resultados de este nuevo análisis mostraron que el primer componente reúne el 86,7% de la varianza total, seguido del segundo componente cuya contribución fue sólo del 8,9%. Así, el primer factor estaría explicando el mayor porcentaje de la varianza total gracias a la influencia de las cuatro variables seleccionadas (Figura 1).

La representación gráfica de los genotipos evaluados sobre el plano factorial (Figura 2) muestra una clara separación de éstos en tres grupos bien definidos. Se observa una mayor variación dentro de los genotipos diploides la cual se halla muy relacionada con su carácter autoincompatible, que los hace materiales de polinización cruzada y por tanto, de amplia variabilidad genética (14).

Considerando la ubicación en el plano bivariado de las variables seleccionadas (Figura 1) y la

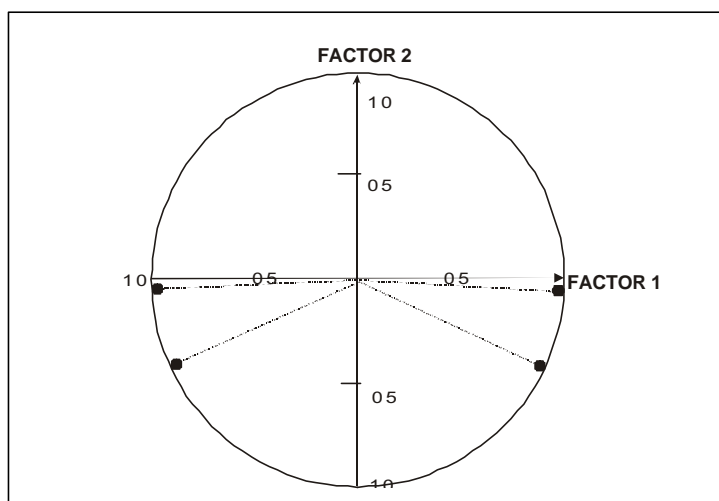


Figura 1. Representación gráfica de la relación entre las cuatro variables seleccionadas y los factores principales generados por el segundo ACP. La ubicación de las variables dentro del plano factorial muestra su correlación con los dos ejes o factores.

distribución de los genotipos estudiados sobre este mismo plano (Figura 2), es claro que los árboles diploides ($2n = 2x$) tienen en general un área foliar y una densidad estomática mayor a la de los demás grupos. Los materiales tetraploides ($4n = 4X$) por su parte, se destacan por presentar un mayor número de cloroplastos en sus células estomáticas, así como una mayor longitud de éstas, mientras que los híbridos triploides ($3n = 3X$), derivados de los anteriores, se mantienen con valores promedios para todas las características.

Al aplicar el análisis Cluster, basado en la metodología de varianzas mínimas de Ward's (12), se obtuvo un fenograma (Figura 3) en donde cada genotipo se asignó a un grupo o "Cluster", de acuerdo con su grado de similitud (medido por el R^2 semiparcial) con respecto a los demás genotipos. Inicialmente es clara la formación de dos grupos definidos: un primer grupo que reúne los genotipos diploides (Cluster 1) y un segundo grupo que comprende los genotipos triploides y tetraploides (Clusters 2 y

3, respectivamente). Éstos se diferencian a un nivel menor de similitud (Figura 3). Con esta información es posible observar que no sólo existe una clara separación entre los tres grupos de ploidía preestablecidos, sino que además es evidente la relación estrecha que existe entre los materiales híbridos (triploides) y los genotipos tetraploides. Tal relación fenotípica es debida a que el híbrido contiene una mayor proporción de genes provenientes del progenitor tetraploide, lo que le confiere mayor afinidad con éste (2).

La relación encontrada entre algunas variables morfológicas asociadas con la estructura misma de la hoja y el nivel de ploidía, ya había sido sugerida por Prakash *et al.* (10). Según estos autores, en las especies *C. arabica* y *C. canephora* una mayor cantidad de dosis de genes se traduce en un incremento en el tamaño de los tejidos de las hojas, incluyendo las células de la epidermis, del tejido esponjoso y del tejido de empalizada. Es de esperar entonces que las características relacionadas con los estomas (densidad, longitud y número de plastidios) y selec-

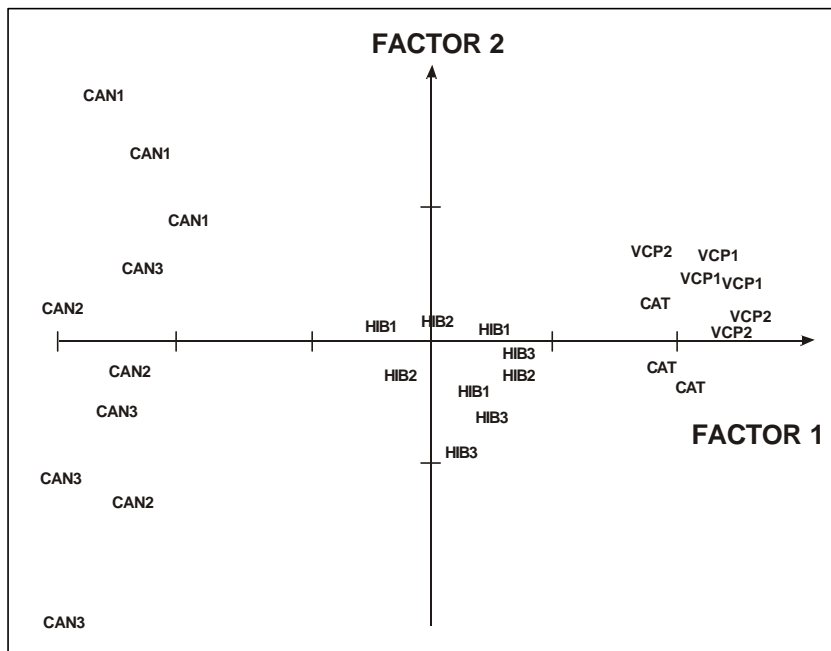


Figura 2. Representación gráfica de la relación entre los árboles estudiados y los factores principales generados a partir de las cuatro variables seleccionadas. Los árboles con características comunes están agrupados en un sector definido del plano factorial.

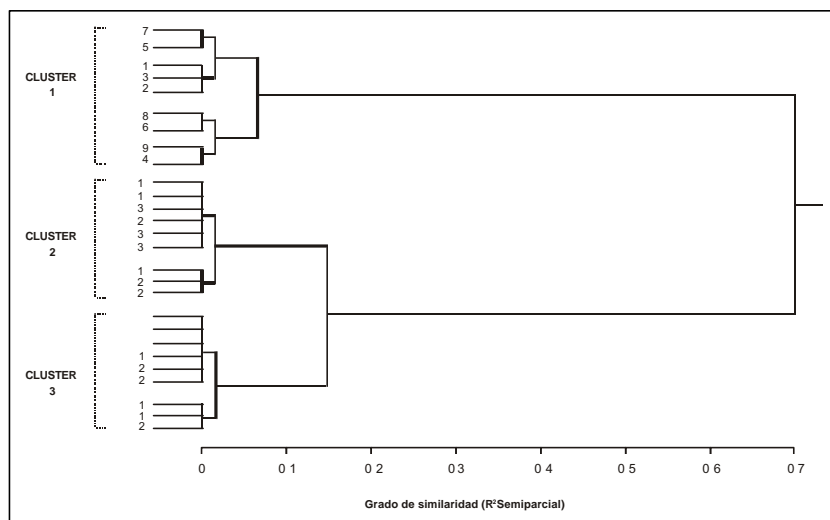


Figura 3. Fenograma derivado del análisis “Cluster” realizado para determinar la asociación entre las cuatro características seleccionadas y los diferentes grupos de ploidía preestablecidos. Cluster 1 (9 genotipos diploides), Cluster 2 (9 genotipos triploides) y Cluster 3 (9 genotipos tetraploides).

cionadas en este trabajo como altamente discriminantes, estén bastante influenciadas por la cantidad de genes presentes en una u otra especie.

Por otro lado, aunque el área foliar fue un carácter fuertemente discriminante en nuestro estudio, no se debe olvidar que es susceptible de variar debido a factores ambientales y en algunos casos, por causas de tipo fisiológico asociadas con la edad de la planta y su dinámica de crecimiento (1).

En conclusión, los datos presentados muestran que el análisis multivariado de las características: DENEST, LONGCEL, CLORCEL (relacionadas con los estomas) y AREAFOL, permiten hacer una separación clara de genotipos con diferente nivel de ploidía dentro de las especies *C. arabica* y *C. canephora*. La aplicación de esta metodología puede hacerse extensiva a otras especies de café, permitiendo una rápida selección de plántulas con diferentes niveles de ploidía.

La evaluación ágil de materiales derivados del cultivo de anteras o de otras metodologías *in vitro*, permitiría reducir notablemente el número de plántulas por caracterizarse mediante recuen-

to de cromosomas, acelerando su selección y posterior evaluación en el campo. La caracterización de híbridos de origen interespecífico o de plantas sometidas a duplicación cromosómica (por tratamientos con colchicina p.ej.), son otras aplicaciones importantes de este tipo de metodologías dentro de un programa de mejoramiento genético.

AGRADECIMIENTOS

A Hernando Cortina de la Disciplina de Mejoramiento Genético de Cenicafé por su ayuda en la selección del material en el campo.

LITERATURA CITADA

1. ARCILA P., J.; CHAVES C., B. Desarrollo foliar del cafeto en tres densidades de siembra. Cenicafé 46 (1): 5 - 20. 1995.
2. BERTHAUD, J. L hybridation interespecifique entre *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* Pierre; obtention et comparaison des hybrides triploïdes, arabusta et hexaploïdes. Café Cacao Thé 22 (2): 87 - 112. 1978.

3. CAPOT, J.; DUPAUTEX, B.; DURANDEAU, A. L'amélioration du caféier en cote d'Ivoire. Duplication chromosomique et hybridation. *Café Cacao Thé* 12(2): 114 - 126. 1968.
4. CHAUDHARI, H. K.; BARROW, J. R. Identification of cotton haploids by stomatal chloroplast - count technique. *Crop Science* 15: 760 - 763. 1975.
5. DUBLIN, P.; PARVAIS, J. P. L'haploidie spontanée liée à la polyembryonie chez le *Coffea arabica* L.. *Café Cacao Thé* 20 (2): 83 - 90. 1976.
6. HO, I.; WAN, Y.; WIINDHOLM, J. M.; RAYBURN, A. L. The use of stomatal chloroplast number for rapid determination of ploidy level in maize. *Plant Breeding* 105: 205 - 210. 1990.
7. NAJCEVSKA, C. M.; SPECKMANN, G. J. Numbers of chloroplast and pollen grains pores in diploid and tetraploid varieties of some trifolium species. *Euphytica* 17: 357 - 362. 1968.
8. NOIROT, M. Polyploidisation de caféiers par la colchicine. *Café Cacao Thé* 22(3): 187 - 194. 1978.
9. OROZCO C., F. J.; CASSALETT D., C. Relación entre las características estomáticas y el número cromosómico de un híbrido interespecífico en café. *Cenicafé* 25(2): 33 - 49. 1974.
10. PRAKASH, N. S.; PADMAJYOTHI, D.; MISHRA, M. K.; RAM, A. S.; SREENIVASAN, M. S. Ploidy level - its influence on leaf anatomical features of *Coffea* L. *Journal of Coffee Research* 23(2): 75 - 83. 1993.
11. QUIN, X.; ROTINO, G. L. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro - grown androgenic pepper plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41: 145 - 149. 1995.
12. SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT Guide for personal computers, Version 6. Cary, SAS Institute, 1987. 1028 p.
13. SREENIVASAN, M. S.; PRAKASH, N. S.; MISHIA, M. K. Evaluation of some indirect ploidy indicators in *Coffea* L.. *Café Cacao Thé* 36 (3): 199 - 205. 1992.
14. SYBENGA, J. Genética y citología del café. Una revisión de literatura. *Turrialba* 10(3): 83 - 137. 1960.
15. WILLIAMS, J. A. A method for differentiating between *Coffea arabica* plants and their hybrids. *Turrialba* 22(3): 263 -267. 1972.