

CENTRO AGRONONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

ESTUDIO DE ALTERNATIVAS PARA LA CONSERVACION IN VITRO DE
CAFE (COFFEA SPP.)

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

MAGISTER SCIENTIAE

por

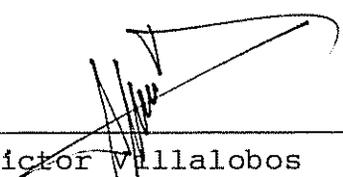
NIDIA GUZMAN VARGAS

CATIE
Turrialba, Costa Rica
1989

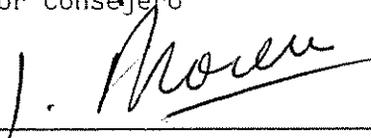
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

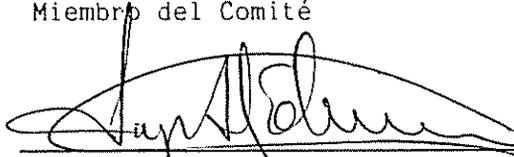
COMITE ASESOR:



Dr. Víctor Villalobos
Profesor Consejero

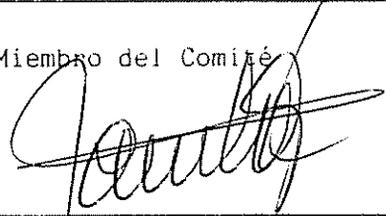


Dr. Jorge Morera
Miembro del Comité

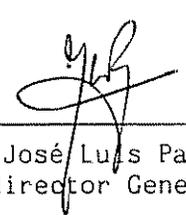


MSc. Jorge Echeverri
Miembro del Comité

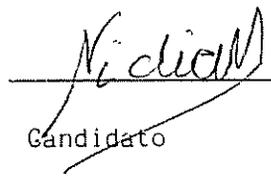
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisi
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Candidato

DEDICATORIA

A tu memoria, Juan

A mis padres Emilce e Isaías, por su ejemplo de
humildad y trabajo

A mi amiga del alma, Paule Silva

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	1
LISTA DE CUADROS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Métodos tradicionales de intercambio y conservación de recursos genéticos de café.....	4
2.2 Métodos de conservación <u>in vitro</u>	6
2.2.1 Almacenamiento en condiciones de creci- miento mínimo.....	7
2.2.2 Conservación de embriones <u>in vitro</u>	9
2.2.3 Métodos de cultivo <u>in vitro</u> aplicados a conservación e intercambio de recursos genéticos de café.....	12
2.3 Uso del manitol en estudios <u>in vitro</u>	16
2.4 Efectos de la sacarosa y del potencial osmótico del medio sobre los tejidos cultivados <u>in vitro</u>	19
2.4.1 Generalidades.....	19
2.4.2 Morfogénesis.....	22
2.4.2.1 Organogénesis.....	23
2.4.2.2 Embriogénesis.....	25
2.4.2.2.1 Embriogénesis a partir de anteras y micró- poras aisladas.....	25
2.4.2.2.2 Embriogénesis somática.....	27
2.4.3 Cultivo de embriones cigóticos.....	29
2.4.4 Uso de la sacarosa en medios de conser- vación.....	32
2.5 Microinjerto.....	33
3. MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1 Localización del ensayo.....	36
3.2 Material vegetal.....	36
3.3 Desinfección de las semillas.....	37
3.4 Medios de cultivo.....	37
3.5 Aislamiento y cultivo de los embriones.....	41
3.6 Microinjerto.....	41
3.6.1 Obtención y preparación de las yemas.....	41
3.6.2 Preparación del portainjerto.....	41
3.6.3 Realización del microinjerto.....	42
3.7. Condiciones de crecimiento de los tejidos culti- vados.....	42

3.8	Análisis de los datos.....	43
3.9	Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la formación de raíces <u>in vitro</u> de embriones cigóticos.....	43
3.10	Efecto de las bajas y altas concentraciones de sacarosa sobre la germinación de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u>	44
4.	RESULTADOS.....	45
4.1	Cultivo <u>in vitro</u> de semillas de <u>C. canephora</u> 'Robusta' y <u>C. arabica</u> 'Caturra'.....	45
4.2	Cultivo de embriones cigóticos aislados.....	46
4.3	Medios de cultivo para embriones.....	47
4.4	Embriogénesis somática.....	49
4.5	Organogénesis de raíces y embriogénesis somática.....	51
4.6	Microinjerto.....	52
4.6.1	Embriones cigóticos como yemas.....	52
4.6.2	Embriones somáticos como yemas.....	52
4.7	Efecto de la variación del potencial osmótico sobre el crecimiento y germinación de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u>	54
4.8	Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de los embriones.....	55
4.8.1	Potenciales osmóticos teóricos de los medios de cultivo utilizados en el presente ensayo.....	55
4.8.2	Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de los embriones cigóticos de <u>C. canephora</u>	59
4.8.3	Formación y desarrollo de raíces.....	66
4.8.4	Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre la germinación de embriones de <u>C. canephora</u>	69
5.	DISCUSION.....	73
5.1	Cultivo <u>in vitro</u> de semillas y embriones aislados....	73
5.2	Microinjerto.....	75
5.3	Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de embriones de <u>C. canephora</u>	77
5.3.1	Efecto de los azúcares sobre el potencial osmótico.....	77
5.3.2	Efecto de la sacarosa y el manitol sobre la muerte, longevidad y viabilidad de los embriones.....	80
5.3.3	Crecimiento de los embriones.....	86
5.3.4	Formación de raíces.....	95
5.3.5	Inhibición de la germinación de embriones.....	101
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	106

7.	BIBLIOGRAFIA.....	108
8.	AFENDICE.....	136

GUZMAN V., N. 1989. Estudio de alternativas para la conservación in vitro de germoplasma de café (Coffea spp.). Tesis Mg. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. p.

Key words: Coffea spp., embryo culture, micrografting, germplasm preservation, germplasm exchange, tissue culture.

SUMMARY

The present study was carried out in the Biotechnology Unit of the Tropical Crops Breeding Program of CATIE at Turrialba, Costa Rica, in order to establish a methodology for the in vitro germplasm exchange and preservation of coffee. The micrografting of embryos and the use of minimal growth culture media for those were studied.

Zygotic and somatic embryos were grafted on plantlets originated from isolated and cultured zygotic embryos. The micrografted plantlets were maintained 7 months in a quiescent state. Adventive somatic embryos were obtained from zygotic embryos of C. canephora cultured on a MS medium with 0.5 mg.l^{-1} AIB and 0.5 mg.l^{-1} BA.

Zygotic embryo growth was inhibited on a MS medium with high sucrose concentrations (12 and 18%) and several mannitol concentrations (0, 0.2, 0.6, 1.2, 2 and 3%). Germination of these embryos was inhibited for 4 months in media with 0, 12 and 18% sucrose and the above mentioned mannitol concentrations. The germination capacity of embryos were restored after transfer to a medium with 2% sucrose.

GUZMAN V., N. 1989. Estudio de alternativas para la conservación in vitro de germoplasma de café (Coffea spp.). Tesis Mg. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. p.

Palabras claves: Coffea spp.; cultivo de embriones, microinjerto, conservación del germoplasma, intercambio del germoplasma, cultivo de tejidos.

RESUMEN

El presente estudio se realizó en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE, Turrialba, Costa Rica con la finalidad de establecer una metodología para el intercambio y conservación in vitro de café. Para tal fin se utilizaron la técnica de microinjerto de embriones y el cultivo en medios de crecimiento mínimo de éstos.

Se injertaron embriones cigóticos y somáticos sobre plántulas provenientes de embriones cigóticos, y las plántulas injertadas se mantuvieron durante 7 meses en estado quiescente. Se obtuvo la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de C. canephora en un medio con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ AIB y $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BA.

Se logró la inhibición del crecimiento de embriones cigóticos de C. canephora en un medio de Murashige y Skoog con altas concentraciones de sacarosa (12 y 18%) y varias

concentraciones de manitol (0; 0,2; 0,6; 1,2; 2 y 3%). La germinación de dichos embriones se inhibió hasta por 4 meses en medios con 0, 12 y 18 % de sacarosa y las concentraciones mencionadas de manitol. La capacidad de germinación de los embriones se reanudó luego de transplantarse a un medio con 2% de sacarosa.

LISTA DE CUADROS

En el texto

Cuadro	Página
1. Concentraciones de sacarosa y manitol utilizadas en el ensayo inicial sobre el crecimiento y germinación de embriones de <u>C. canephora</u>	39
2. Concentraciones de sacarosa y manitol utilizadas en el segundo ensayo de crecimiento de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u>	39
3. Potenciales osmóticos calculados de los medios con sacarosa utilizados con embriones de <u>C. canephora</u>	56
4. Potenciales osmóticos calculados de los medios con manitol utilizados en ensayos con embriones de <u>C. canephora</u>	57
5. Potenciales osmóticos calculados (en bares) de los medios de cultivo utilizados con embriones de <u>C. canephora</u>	58
6. Embriones muertos después de 15 días de cultivo en medios con 0% de sacarosa y varias concentraciones de manitol.....	61
7. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la formación de raíces de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u> a los 30 días de cultivo.....	67
8. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre la germinación de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u>	70
9. Embriones germinados en un medio al 2% de sacarosa luego de cultivarse bajo condiciones específicas.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura Nº		Página
1.	Embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u>	50
2.	Diferenciación de raíces y embriones somáticos a partir de explantes foliares de plántulas de <u>C. canephora</u>	50
3.	Microinjerto de embriones de <u>C. canephora</u> <ul style="list-style-type: none"> a. con embriones cigóticos de <u>C. arabica</u> 'Caturra' b. con embriones somáticos de <u>C. canephora</u> luego de dos meses de cultivo..... 	53
4.	Microinjerto de un embrión cigótico de <u>C. canephora</u> con un embrión somático de <u>C. canephora</u>	53
5.	Embriones de <u>C. canephora</u> luego de 3 meses de cultivo en un medio con 0% de sacarosa y 0% de manitol <ul style="list-style-type: none"> a. Embriones muertos b. Embriones con buen desarrollo de la parte aérea..... 	60
6.	Efecto de diferentes concentraciones de manitol y sacarosa sobre el peso fresco de embriones de <u>C. canephora</u> a los 15 días de cultivo.....	63
7.	Efecto de diferentes concentraciones de manitol y sacarosa sobre el peso seco de embriones de <u>C. canephora</u> a los 15 días de cultivo.....	64
8.	Efecto del manitol con 0% de sacarosa sobre el crecimiento de embriones aislados de <u>C. canephora</u>	65
9.	Embrión enraizado de <u>C. canephora</u> en un medio con 8% de sacarosa y 0% de manitol después de 30 días de cultivo.....	68
10.	Embrión de <u>C. canephora</u> luego de 4 meses de cultivo en un medio con 12% de sacarosa y 3% de manitol.....	71
11.	Embrión de <u>C. canephora</u> luego de 4 meses de cultivo en un medio con 18% de sacarosa y 0% de manitol.....	71

1. INTRODUCCION

La semilla constituye el mecanismo biológico tradicional de intercambio y preservación de germoplasma. Sin embargo, en varias especies de importancia económica, la utilización de semillas presenta limitaciones, por ejemplo en aquellas cuya propagación se realiza por medios vegetativos, las que poseen periodos de juvenilidad prolongada y finalmente en aquellas cuyas semillas no son viables o muestran un comportamiento fisiológico recalcitrante.

La semilla de café, bajo condiciones naturales, presenta una capacidad germinativa de corta duración, lo cual dificulta su uso para el intercambio de germoplasma. Además, aunque recientemente se ha reclasificado como semilla ortodoxa, por poseer un punto crítico de humedad relativamente bajo (8-9%), lo cual contradice trabajos anteriores; su longevidad con los métodos más recientes de conservación, raramente sobrepasa los dos años; lo cual indica dificultades para su almacenamiento a mediano y largo plazo.

Los métodos de cultivo in vitro, como herramienta biotecnológica al servicio del fitomejoramiento, se han utilizado con diversos propósitos, entre ellos: la propagación clonal, eliminación de patógenos, el rescate y cultivo de embriones inmaduros no viables, obtención de plantas haploides y la generación de variabilidad. También

este grupo de técnicas ofrece una solución práctica para la colecta e intercambio (León y Withers 1986) así como para la conservación de recursos fitogenéticos.

La disponibilidad de la biotecnología, aunada a las dificultades de conservación de la semilla, y los costos y riesgos que implica el mantenimiento de las colecciones vivas, así como la necesidad de creación y evaluación de nuevos genotipos de Coffea, ha hecho que los mejoradores propongan la constitución de colecciones in vitro, basándose en los progresos recientes en este campo (Charrier 1986).

La conservación in vitro de embriones somáticos y cigóticos, ofrece una alternativa para el almacenamiento de semillas con fines de preservación de germoplasma, en especial para aquellas que no toleran la baja humedad como en el caso de muchas especies tropicales (Grout et al. 1986; Bajaj 1987). Al respecto, Charrier (1986) estima que la crioconservación de meristemas y embriones somáticos y cigóticos sería equivalente al almacenamiento de semillas de las especies ortodoxas en cámara fría. Sin embargo, la crioconservación de meristemas de café presenta dificultades (Baumann 1986).

El presente estudio intenta, mediante el cultivo de embriones, encontrar un método alternativo de difusión y conservación de recursos genéticos de café, empleando embriones cigóticos y somáticos; evaluar el efecto de reguladores osmóticos sobre la viabilidad de embriones cigóticos, cuyos resultados podrían utilizarse

posteriormente en estudios de crioconservación; utilizar la técnica de microinjerto como una vía para mantener embriones somáticos y cigóticos viables, en estado quiescente y así promover el intercambio de germoplasma.

En esta investigación se proponen las siguientes hipótesis: a) la ausencia de sacarosa en el medio de cultivo permite mantener en estado viable y de inhibición de crecimiento embriones cigóticos de Coffea; b) los bajos potenciales osmóticos en el medio de cultivo, con altas concentraciones de sacarosa y manitol, reducen el crecimiento e inhiben la germinación de embriones cigóticos; c) el método de microinjerto in vitro con embriones cigóticos y somáticos, puede desarrollarse en café, y constituir un método de conservación y distribución de germoplasma.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Métodos tradicionales de intercambio y conservación de recursos genéticos de café

Varios autores consideran que la capacidad de germinación de la semilla de café, en condiciones de humedad y temperatura ambientales, disminuye rápidamente (Coste 1955; Couturon 1980). Entre las causas, se mencionan los efectos negativos de la luz (Borel 1947; Dufournet 1949, citados por Coste 1955) y la poca resistencia al desecamiento excesivo (Thomas 1937). Además, la ubicación casi superficial del embrión lo predispone a daños mecánicos o por frío o calor excesivos y favorece su expulsión fuera de la semilla, por efecto del agua (Quintero 1968, citado por Arcila Pulgarín 1987). La reducción de la germinación, provocada por la desecación, se ha atribuido al rompimiento de los plasmodesmos (Genkel y Chao 1958), que existen en las células parenquimáticas del endosperma (Mello Ayres 1954; Dedecca 1958) que favorecen el transporte de sustancias durante la germinación (Mello Ayres 1954). Sin embargo, Bendaña (1962a) duda que este sea el efecto primario de las altas temperaturas. Crocker y Barton (1957, citados por Bendaña et al 1962a), consideran que cualquier disminución en la humedad, provoca una contracción de las hemicelulosas del endosperma la cual, a su vez, causa la estrangulación del embrión.

Sin embargo, Bacchi (1958) determinó que la viabilidad de las semillas húmedas, conservadas en recipientes abiertos, se mantuvo inalterada por 8 a 10 meses.

Los trabajos publicados no concuerdan respecto a las condiciones óptimas y duración del almacenamiento de la semilla de café. Según Bacchi (1958) la longevidad de las semillas, cuando se almacenan en recipientes cerrados y a temperatura de laboratorio no controlada, fue inversamente proporcional a su contenido de humedad inicial: 4, 8 y 21 meses a 20%, 13% y 10% de humedad. Valencia (1970) encontró que, cuando las semillas se almacenan con un contenido de humedad alto (35-40%) o bajo (12-15%), en una atmósfera no controlada; el poder germinativo, al cabo de 5 meses, es menor del 60%. Sin embargo, Bendaña (1962) considera que las semillas con 9-11% de humedad pueden mantener su viabilidad por más de dos años (Bendaña 1962a) y hasta por cuatro años, según Wellman y Toole (1960), cuando se almacenan a 50% de humedad relativa y a 10°C. Van der Vossen (1980) informa que las semillas secas (10-11% de humedad) pueden conservarse hasta por dos años a 15°C; pero cuando se almacenan húmedas (13-15%), su capacidad de germinación se reduce debido, posiblemente, a la muerte fisiológica del embrión. A 19°C y 100% H.R., las semillas de especies que crecen a bajas altitudes (*C. canephora* y *C. stenophylla*), pueden conservarse por 11 meses, y las de *C. arabica*, hasta por 30 meses (Couturon 1980).

La semilla de café es más resistente a las bajas temperaturas que las de otras especies, consideradas como recalcitrantes (Van der Vossen 1980). Sin embargo a 4°C, las semillas de C. arabica mueren a los 4 meses (Couturon 1980). A temperaturas inferiores a cero, la capacidad de germinación se pierde en pocos días (Wellman y Toole 1960; Van der Vossen 1980), independientemente del contenido de humedad inicial (Van der Vossen 1980).

El café se ha considerado como especie recalcitrante debido al comportamiento de la semilla durante el almacenamiento (Huxley 1964b; Roberts 1975; Chin 1978; Becwar et al. 1983) y por la resistencia del polen a la conservación por largos periodos (Roberts 1975). Sin embargo, se ha demostrado que la semilla de café tolera la deshidratación a niveles relativamente bajos; 5% (Bendaña 1962) u 8-9% (Bacchi 1955, 1956; Huxley 1964b). Recientemente, la semilla de café ha sido reclasificada como ortodoxa (Ellis et al. 1985). Sin embargo, éste constituye un punto de controversia. Côme (información personal) la considera como «falsa recalcitrante» y Becwar et al. (1983) como «recalcitrante, tolerante a la desecación».

2.2 Métodos de conservación in vitro

El propósito del almacenamiento en condiciones in vitro es reducir el metabolismo y la división celular de los tejidos, al mismo tiempo que se aumente su longevidad y se

reduzca al mínimo la posibilidad de cambios genéticos. Los procedimientos utilizados incluyen: a) el uso de medios de cultivo de crecimiento mínimo, con la creación de estrés osmótico, reducción o aumento de la concentración de sacarosa, o con inhibidores del crecimiento; b) creación de hipoxia en los tejidos, cubriéndolos con una capa de aceite inerte; c) uso de temperaturas bajas, no congelantes, junto con reducción de la iluminación, cuando las plantas no muestran sensibilidad al frío. Estos métodos citados permiten disminuir la frecuencia de transferencias, pero no suprimen totalmente los riesgos de deriva genética, los cuales disminuyen conforme aumenta el nivel de organización celular del tejido cultivado. La crioconservación (almacenamiento a -196°C , temperatura del nitrógeno líquido) es, hasta ahora, el único método que garantiza la preservación de germoplasma a largo plazo, en condiciones de alta estabilidad genética.

2.2.1 Almacenamiento en condiciones de crecimiento mínimo

En muchos estudios de conservación de germoplasma *in vitro*, se ha tratado de manipular el medio de cultivo con diferentes sustancias, como reguladores osmóticos y del crecimiento.

El almacenamiento en condiciones de crecimiento mínimo fue descrito por primera vez en callos de Daucus (Nitzsche

1978). El tratamiento consistió en secar los callos por 7 días al flujo de aire de una campana y cultivarlos posteriormente en un medio basal más 10 mg.l^{-1} de ABA y 5% de sacarosa. Los callos reanudaron el crecimiento al transferirse a un medio fresco y posteriormente se regeneraron plantas (Nitzsche 1978). Un 73% de los callos reanudó el crecimiento, luego de mantenerse por un año a 25% de H.R. y 15°C ; sin embargo, al cabo de ese periodo, no se diferenciaron plantas a partir de ellos (Nitzsche 1980).

Las altas concentraciones de sacarosa pueden utilizarse para mantener cultivos en una condición latente ("quiescente") por largos periodos, ya que éstas presentan efectos inhibitorios pero no tóxicos sobre los tejidos (Schenk y Hildebrandt 1972). Las altas concentraciones de sacarosa (Schilde-Rentschler et al. 1982; Rublúo y Kartha 1985); así como las altas concentraciones de manitol (Schilde-Rentschler et al. 1982; Staritsky et al. 1986) se han utilizado para conservar diversos tejidos in vitro..

Austruy, citado por Codron et al. (1978), logró prevenir la proliferación de células de frutos de manzana en un medio que, por otras condiciones, era apto para la multiplicación. Aparentemente la acción de las concentraciones altas de sacarosa se debe a un efecto osmótico. Las células de frutos de pera, cultivadas en un medio desprovisto de auxina exógena, mantuvieron su viabilidad al mismo tiempo que detuvieron su crecimiento, cuando la osmolaridad del medio se aumentó con la adición de $0,385 \text{ M}$ o con el incremento en

la concentración de sales (Codron et al. 1978). El manitol (Kishor y Reddy, 1986 a,b) y el sorbitol (Kishor y Reddy 1986 a,b; Kumar et al. 1988) ayudan a mantener la capacidad de regeneración en cultivos a largo plazo.

La ausencia de sacarosa en el medio de cultivo también puede inhibir el crecimiento de plántulas (Kantha et al. 1981) o la germinación de embriones somáticos (Jones 1974), al mismo tiempo que mantiene la viabilidad de los tejidos.

2.2.2 Conservación de embriones in vitro

Las semillas, según su comportamiento fisiológico durante el almacenamiento, se clasifican en dos categorías: ortodoxas y recalcitrantes (Roberts 1973). Las primeras aumentan su longevidad, y mantienen su viabilidad por períodos incluso mayores de cien años, cuando se almacenan en condiciones de baja humedad (5-7%) y temperatura (-18 C) (Roberts et al. 1984). Las semillas recalcitrantes, por su parte, poseen un mayor contenido de humedad y no toleran la reducción de ésta más allá de un nivel relativamente alto, sin una consecuente pérdida de la viabilidad (Roberts 1973; King y Roberts 1979; Roberts y King 1980). De esta manera, su almacenamiento a largo plazo presenta problemas, ya que no pueden utilizarse las técnicas convencionales diseñadas para semillas ortodoxas. Estas semillas carecen del mecanismo que programa la inhibición del metabolismo que precede y acompaña la desecación y

poseen una estrategia que les permite resistir al secado por medio del aporte de metabolitos de reserva para la rápida germinación bajo condiciones aptas (Nkang y Chandler 1986). Varios cultivos tropicales de valor alimenticio e importancia económica, tales como aguacate, coco, cacao, mango, caucho, poseen semillas recalcitrantes (Roberts et al. 1984). Las consideraciones anteriores enfatizan la necesidad de buscar nuevos métodos de conservación a mediano y largo plazo para estas especies (Roberts et al. 1984; Grout et al. 1986). Anteriormente, la asignación de una de las dos categorías a las semillas de determinada especie, se complicó por el comportamiento aparentemente recalcitrante de algunas semillas ortodoxas, principalmente por el desconocimiento de la relación entre los efectos del secado y la fisiología de la semilla (Roberts et al. 1984). Por ejemplo, en algunas especies, la disminución de la germinación, provocada por el secado, se debe a la pérdida de capacidad de rehidratación de la cubierta seminal (Mumford y Grout 1979; Grout et al. 1983; Roberts et al. 1984). Esta característica limita el uso de semillas enteras para la conservación *in vitro*, aunque éstas constituyen el material más apto, ya que otros tejidos tienden a sufrir alteraciones durante el proceso (Nitzsche 1983).

Por ello, una alternativa para la conservación de semillas recalcitrantes, la constituye el cultivo de embriones cigóticos, en los casos en que la técnica se

encuentra desarrollada; o somáticos, para las especies que responden fácilmente a este tipo de multiplicación (Engelmann y Baubault 1986).

Se han realizado varias investigaciones sobre la tolerancia a la temperatura del nitrógeno líquido, tanto de embriones cigóticos (Grout et al. 1979; Baja; 1984; Zavala y Sussex 1985; Engelmann y Baubault 1986; Pritchard y Prendergast 1986) como somáticos (Withers 1979; Engelmann et al. 1985, 1987; Engelmann y Duval 1986; Engelmann y Dereuddre 1988a; Gupta et al. 1987; Bertrand-Desbrunais et al. 1988). Sin embargo, la crioconservación de embriones de semillas recalcitrantes presenta problemas de manipulación (Pritchard y Prendergast 1986) y de baja capacidad de regeneración (Normah et al. 1986, citados por Withers 1987; Pritchard y Prendergast 1986). Los embriones también podrían almacenarse en forma de semillas sintéticas, encapsulados en resinas hidrosolubles, luego de una deshidratación parcial, (Kitto y Janick 1985a,b,c; Redenbaugh et al. 1986), o con una capa superficial de aceite (Caplin 1959), como se ha hecho con callos (Augereau et al. 1986). También existe la posibilidad de utilizar las técnicas de liofilización in vitro, como en el caso de polen de Pinus (Ahlgren y Ahlgren 1978).

Un método más barato y simple, lo constituye el almacenamiento con limitación del crecimiento, al cual se espera que los embriones respondan fácilmente, pues poseen una fase de latencia natural dentro de la semilla (Jones

1974; Withers 1985). Sin embargo, dicha técnica sólo se utilizó con embriones somáticos de Daucus en los cuales la ausencia de sacarosa del medio, provocó una inhibición de la germinación hasta por dos años, con posterior regeneración de los mismos, la cual aumentó en relación inversa a la edad del embrión (Jones 1974). Los cultivos paralelos, en condiciones no inhibitorias, perdieron el potencial embriogénico (Jones 1974), lo cual demuestra la capacidad estabilizadora de este tipo de conservación (Withers 1985).

Roberts y colaboradores recomiendan que los estudios futuros sobre el almacenamiento de embriones se basen en la investigación del efecto de reguladores osmóticos (v. gr. polietilenglicol) o del crecimiento, sobre la inhibición de la germinación (King y Roberts 1979; Roberts et al. 1984).

2.2.3 Métodos de cultivo in vitro aplicados a la conservación e intercambio de recursos genéticos de café

El cultivo in vitro ha permitido la aplicación de diferentes metodologías: microestacas, neoformación de yemas, embriogénesis somática y cultivo de ápices meristemáticos, para la micropropagación de genotipos de café, especialmente de aquellos que no pueden perpetuarse por semilla, como las variedades no fijadas (híbridos F₁) de C. arabica (Laboratorio de Cultivo de Tejidos CATIE

PROMECAFE) y las descendencias de cruces interespecíficos de C. arabica y C. canephora (Dublin 1984; Zok 1986).

Además, estas técnicas ofrecen a los fitomejoradores, la posibilidad de disminuir las restricciones de tiempo, que el hábito perenne del café impone, para el análisis y selección de nuevos cultivares (Söndhal y Sharp 1977). Así, por ejemplo, Söndhal et al (1984), informan del cultivo exitoso de embriones inmaduros, producto de cruces interespecíficos de Coffea. También las técnicas in vitro constituirían un método para la generación de variabilidad genética y la selección de individuos deseables (Monaco et al 1977; Baumann 1986), la cual sería de suma importancia principalmente en los cultivares de C. arabica, que poseen una estrecha base genética (Söndhal et al. 1984). Otros campos de aplicación serían la disminución de la relación núcleo-citoplasma, por medio de hibridización somática, y la fijación, por haploidia, de estructuras heterogéneas (Charrier 1986). Aunque en café la producción de haploides, por medio del cultivo de anteras o de polen aislado, no ha sido muy exitoso; la recuperación de haploides espontáneos se ha logrado, por medio del injerto in vivo, de embriones de C. canephora, provenientes de semillas poliembriónicas (Couturon 1982).

Los mejoradores proponen la utilización de estos métodos para la difusión y conservación de recursos genéticos, para obviar las limitaciones que conlleva el uso

de semillas y el mantenimiento de colecciones vivas de café (Kantha et al 1981; Charrier 1986).

El cultivo de plantas in vitro, en condiciones de limitación del crecimiento, llenaría, según Charrier (1986) ambas expectativas. Por ejemplo, Kantha et al (1981), mantuvieron plántulas de dos cultivares de C. arabica, provenientes de brotes apicales, durante dos años, a 26°C en un medio sin sacarosa, sin necesidad de transferencia a medio fresco. Baumann (1986) propone, como método simple de conservación, el cultivo de semillas en recipientes sellados con agar y sin nutrientes.

Algunos estudios sugieren la posibilidad de utilizar la técnica de crioconservación en café. Becwar et al (1983), trataron de conservar semillas a -196°C; las semillas no sobrevivieron al congelamiento rápido, a pesar de la deshidratación hasta un límite mínimo de 8%. Sin embargo, cuando se congelaron hasta -80° con una menor velocidad de enfriamiento, se obtuvo un 60% de sobrevivencia; lo cual podría indicar la posible utilización del congelamiento lento para este tipo de estructura. Baumann (1985), informa que se han podido conservar suspensiones celulares vivas luego del congelamiento; sin embargo, la viabilidad de los cultivos se perdió a las pocas horas posteriores al congelamiento. Embriones cigóticos jóvenes de C. arabica, mantuvieron la capacidad de embriogénesis adventicia, luego de la congelación en nitrógeno líquido, con congelamiento lento hasta -40°C y con un precultivo en un medio rico en

sacarosa (0,75 M) y un tratamiento crioprotector (Bertrand-Desbrunais et al 1988). Baumann (1986) considera que la crioconservación de meristemas podría dificultarse por su baja tolerancia al congelamiento debido, en parte, a la presencia de alcaloides purínicos. Charrier (1986) propone la creación de bancos de polen, mediante la aplicación de técnicas de liofilización y criogenia, con el fin de facilitar el intercambio de progenitores masculinos. Augereau et al. (1986) lograron preservar callos de C. arabica bajo capa de aceite a 15°C en la oscuridad, durante 4 meses sin realizar ningún subcultivo. Los autores proponen este método como alternativa para la crioconservación.

El cultivo de embriones cigóticos y somáticos se vislumbra como un método atrayente para la conservación e intercambio de germoplasma de café (Charrier 1986). Tanto el cultivo de embriones cigóticos (Colonna et al 1971; Colonna 1972; Rabéchault y Cas 1973; Söndhal et al 1984; Laboratorio de Cultivo de Tejidos CATIE/PROMECAFE), como somáticos (Söndhal y Sharp 1977; Söndhal et al 1984; Dublin 1984, Laboratorio de Cultivo de Tejidos CATIE/PROMECAFE), se han realizado con éxito en café.

2.3 Uso del manitol en estudios in vitro

En las condiciones normales del cultivo in vitro, las células están expuestas a potenciales hídricos (y osmóticos) similares a los que presenta el suelo para el crecimiento de las plantas, los cuales varían en un ámbito de 0 a -15 bares (bajo irrigación y sequía, respectivamente) (Thorpe 1985). Los efectos del estrés osmótico pueden evaluarse con la adición al medio de cultivo, de sustancias no electrolíticas. El compuesto utilizado debe reunir ciertas características. La penetración a través del plasmalema debe ser suficientemente lenta, para impedir el rápido equilibrio de la concentración de soluto, de modo que en el transcurso de un experimento largo, la cantidad de producto que fluye sea mínima. Además el producto no debe ser metabolizable ni tóxico (Cram 1984).

El uso del manitol como osmoregulador es controversial respecto a estos tres aspectos. Su constitución química, una molécula pequeña con 6 grupos hidroxilo (poliol), hace suponer que su penetración a la célula es pasiva y lenta, como sucede en muchos organismos (Cram 1984). Sin embargo en varios tejidos vegetales se ha demostrado su penetración (Riov y Yang 1982; Cram 1984; Creelman y Zeevart, 1985; Cress y Johnson 1987). Incluso en algunas especies constituye el principal azúcar traslocado, en cuyo caso no es deseable como sustancia osmótica (Cram 1984). Su metabolismo varía según las especies y sistemas usados, y

también es un punto de discrepancia (Riov y Yang 1982; Cram 1984). En varios estudios se ha demostrado la evolución de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente del manitol marcado, lo cual indica que este azúcar es utilizado por algunos tejidos como fuente de energía (Thompson y Thorpe 1981; Riov y Yang 1982; Cress y Johnson 1987). Este soluto puede ser metabolizado a sacarosa (Riov y Yang 1982) y a prolina (Cress y Johnson 1987).

El manitol provoca un aumento en la concentración de ácido abscísico (ABA) endógeno y en el medio (Wong y Sussex 1980; Creelman y Zeevart 1985) atribuido al efecto negativo del producto sobre la pérdida de turgencia de las células y no a la disminución en el potencial osmótico per se (Creelman y Zeevart 1985). El manitol, en bajas concentraciones (0,01 y 0,1 M), causa un incremento en la síntesis de etileno, por la acción directa sobre la síntesis de éste (Riov y Yang 1982). Sin embargo, las concentraciones plasmolizantes (0,5 M) de manitol, inducen la síntesis de este regulador, por efectos del estrés osmótico (Imaseki y Watanabe 1978). En callos de Fraxinus (Wolter y Skoog 1966), el manitol cumple una función nutricional, no así en callos de tabaco (Hildebrandt y Riker 1949) ni de Solanum (Van der Plas y Wagner 1984). En el cultivo de embriones no parece actuar como fuente de carbono (Rietsema et al. 1953; Rabéchault et al. 1974) y en algunos de ellos causa un efecto tóxico (Ball 1959; Pretova 1974). El manitol, en concentraciones no plasmolizantes (0,4M),

sustituye la auxina en la prolongación de la viabilidad de las células (Codron et al. 1978, 1979; Pech y Romani 1979).

El manitol reduce el potencial osmótico del medio y de los tejidos (Kirkham et al. 1972; Pritchard et al. 1986b, Cress y Johnson 1987; Chandler y Thorpe 1987), así como la presión de turgencia de las células (Kirkham et al. 1972). En sistemas in vitro, la disminución del potencial osmótico con osmoreguladores, provoca una reducción progresiva en la expansión y un aumento en la mitosis celulares (Adamson 1962). En células en suspensión, el estrés osmótico reduce el volumen y el diámetro de las células (Maretzki et al. 1972); el número de células, volumen celular y grosor de la pared (Pritchard et al. 1986). El peso seco de los tejidos se reduce (Wong y Sussex 1980; Pritchard et al. 1986a), aunque en menor grado que el peso fresco; debido a la disminución en la absorción de agua. A nivel bioquímico se reduce la concentración de azúcares reductores y la actividad de la invertasa, mientras que la concentración de sacarosa aumenta; también se produce una acumulación de aminoácidos, especialmente arginina e histidina (Maretzki et al. 1972). Además, en algunos sistemas, aumenta los niveles endógenos de prolina (Cress y Johnson 1987; mientras que en otros los reduce (Pritchard et al. 1986b).

En referencia a las teorías sobre la elongación celular, existe controversia respecto a si el estrés osmótico inhibe o no la elongación inducida por la auxina. arré et al. (1973), encontraron que en segmentos de

entrenados de Pisum, el aumento en la osmolaridad del medio no afecta el descenso de pH estimulado por la auxina, pero inhibe la elongación celular. Rubinstein (1977) y Masuda et al. (1978), en coleóptilos de avena, concuerdan que el estrés osmótico estimula la acidificación. Sin embargo, Rubinstein (1977) demostró que también se inhibe la elongación inducida por la auxina; mientras que Masuda et al. (1978), no pudieron demostrar este efecto. La acidificación de la pared, inducida por la auxina, es, según la teoría del crecimiento ácido (Cleland 1977), uno de los mecanismos por los cuales la auxina induce la elongación de las células. Además, el impacto osmótico moderado incrementa el transporte basípeto de la auxina, aunque el estrés excesivo lo inhibe (Sheldrake 1979). Según Cande y Ray (1976) el estrés osmótico (inducido con 0,5-0,7 M de manitol) provoca el rompimiento de los plasmodesmos en coleóptilos de gramíneas (Cande y Ray 1976).

2.4 Efectos de la sacarosa y del potencial osmótico del medio sobre los tejidos cultivados in vitro

2.4.1 Generalidades

Los tejidos cultivados in vitro, aún aquellos que presentan actividad fotosintética, no son autotróficos respecto al carbono, por lo que requieren un aporte exógeno de este elemento (Thorpe 1985). La sacarosa, principal azúcar transportado en el floema de las plantas, y las

hexosas que la forman (glucosa y fructosa), constituyen las mejores fuentes de energía para los tejidos cultivados in vitro (Thorpe 1985).

La sacarosa puede sufrir hidrólisis parcial previo a la siembra del explante (Thorpe y Meier 1973; Singha et al. 1987) o degradación (Rabéchault et al. 1974). En algunos casos, citados por Thorpe (1985), se observó inversión extracelular de la sacarosa por acción de enzimas localizadas en las paredes celulares de los tejidos. La omisión de ácido indolacético (AIA) puede provocar un aumento en los azúcares reductores, tanto en el medio como en el tejido, por hidrólisis progresiva de la sacarosa (Helgeson et al. 1972). Sin embargo, en la mayoría de los tejidos, la sacarosa penetra a la célula como molécula intacta, donde es desdoblada por la acción de dos sistemas enzimáticos: invertasa soluble y, en menor grado, por la sacarosa fosfato sintetasa. La glucosa entra al metabolismo como glucosa 6-fosfato, reacción catalizada por la hexoquinasa, la cual regula el flujo de glucosa hacia la glicólisis y a la vía de las pentosas fosfato (Thorpe 1985). Varios autores han atribuido la superioridad de la sacarosa como fuente nutricional, comparativamente con otros carbohidratos, a los resultados de Doudoroff et al. (1943), quienes demostraron una mayor facilidad de fosforilación de este azúcar, respecto a la glucosa, fructosa o una mezcla de ellas. Los compuestos fosforilados constituyen una parte importante en la absorción a nivel de plasmalema donde.

aparentemente, interviene un mecanismo activo, mientras que a nivel de apoplasto su absorción es pasiva (Thorpe 1985).

El papel de la sacarosa no sólo es nutricional, en el sentido de proveer energía y carbono para las vías metabólicas; sino también algunos autores sugieren un papel sobre la regulación del nivel hormonal (Butcher y Street 1960; Granatek y Cockerline 1978; Takayama y Misawa 1981). Además, por constituir la mayoría de las sustancias osmóticamente activas del medio de cultivo, algunos de sus efectos sobre el crecimiento, se atribuyeron, desde los inicios del cultivo de tejidos, a los cambios que provoca en el potencial osmótico del medio (Gautheret 1955). La hidrólisis de la sacarosa, provocada por la esterilización en autoclave, causa un aumento en los valores osmóticos teóricos del medio de cultivo (Rietsema et al. 1953; Dunwell y Thurling 1985). La auxina, que cumple una importante función en el crecimiento y morfogénesis de los tejidos cultivados *in vitro*, también causa una alteración en el potencial osmótico (Ketelapper 1953). Está ampliamente documentado que la reducción del contenido de sacarosa en el medio reduce el crecimiento de los tejidos.

En estudios con coleóptilos, se ha demostrado que la sacarosa estimula la elongación celular producida por la auxina, debido al efecto osmótico sobre el aumento de la excreción de protones (acidificación de la pared) (Stevenson y Cleland 1981). Además, provoca un aumento en los niveles

de UDP-glucosa, intermediario en la síntesis de polisacáridos de la pared celular (Inohue et al. 1987).

La reducción de la concentración de sacarosa estimula el enverdecimiento de los tejidos (Barg y Umiel 1977), y las altas concentraciones lo inhiben (Edelman y Hanson 1972). La reducción de la osmolaridad del medio también afecta negativamente el enverdecimiento de los tejidos (Barg y Umiel 1977). La ausencia (Webster y Henry 1987) o la presencia (Baysdorfer y Vanderwoude 1988) de sacarosa pueden regular la síntesis de algunas proteínas.

2.4.2 Morfogénesis

Además del efecto cualitativo y cuantitativo de la sacarosa sobre el crecimiento, ésta cumple una función importante en los diferentes procesos morfogénicos. La concentración de sacarosa puede, en un mismo sistema, orientar la morfogénesis hacia diferentes vías (Sharp et al. 1971; Menon y Lal 1972).

A continuación se describirá el papel de la sacarosa y del potencial osmótico del medio sobre ambas rutas morfogénicas.

2.4.2.1 Organogénesis

Las concentraciones óptimas para la organogénesis varían según la especie y el tipo de diferenciación, el cultivar, la presencia de reguladores del crecimiento, las condiciones de luz y la composición mineral del medio.

Muchos de los efectos organogénicos de los azúcares se atribuyen a su acción sobre el potencial osmótico. Tran Thanh Van (1977) sugiere que bajo la misma relación auxina/citocinina, la organogénesis varía de acuerdo a la cantidad y calidad de carbohidratos, cuya acción es tanto metabólica como osmótica. Esta última se ha demostrado en diferentes sistemas experimentales (Whittier y Steeves 1960; Shepard y Totten 1977; Brown et al. 1979).

En la diferenciación de brotes in vitro de varios tejidos, se ha observado que el número de brotes aumenta junto con el nivel de sacarosa del medio, hasta una concentración óptima (Brown et al. 1979; Douglas 1985), generalmente 1-3%. A partir de ella, disminuye la eficiencia de la organogénesis (Brown et al. 1979; Bhatt et al. 1983; Douglas 1985). La importancia del metabolismo de los carbohidratos, en el proceso organogenético, es evidente; debido a la acumulación de almidón que ocurre en las etapas iniciales de la inyección de los centros meristemáticos. El almidón desaparece posteriormente, a medida que se forman los brotes (Patel y Berlyn 1983; Thorpe

1985). La ausencia de organogénesis a concentraciones altas de sacarosa se ha asociado con una acumulación de almidón (Hammersley-Straw y Thorpe 1988). El acumulamiento inicial de almidón depende de la concentración de sacarosa en el medio (Brossard-Chriqui e Iskander 1980; Thorpe et al. 1986). Thorpe et al. (1986), demostraron que la síntesis de almidón se realiza directamente a partir de la sacarosa del medio. En callos de tabaco, la diferenciación de brotes conlleva una alta tasa de respiración y constituye un proceso altamente endergónico. Se considera que el almidón actúa como fuente energética y, además, como fuente de agentes osmóticos, en forma de azúcares solubles (Thorpe 1985). En el dicho sistema, la sacarosa, a la concentración óptima, actúa en una relación 2/3 a 1/3 como fuente de energía y regulador osmótico, respectivamente (Brown et al. 1979). Además, los tejidos organogénicos presentan una mayor presión osmótica que aquellos en condiciones de proliferación (Brown y Thorpe 1980; Hammersley-Straw y Thorpe 1988). Sin embargo, la acumulación de almidón no siempre se correlaciona con el proceso organogénico (Granatek y Cockerline 1978; Von Arnold 1987; Vasseur et al. 1987). En algunos sistemas, el ácido giberélico (AG_3) inhibe la organogénesis por su efecto paralelo sobre la acumulación de almidón (Thorpe et al. 1986). Sin embargo, en callos obtenidos a partir de embriones sexuales de

Hordeum, el AG₃ aumenta la osmolaridad de las células y estimula la formación de brotes (Granatek y Cockerline 1978).

2.4.2.2 Embriogénesis

2.4.2.2.1 Embriogénesis a partir de anteras y micrósporas aisladas

En la obtención de embriones haploides, en general, se utiliza la sacarosa al 2-3%. Sin embargo, en muchas especies, tanto por cultivo de anteras como por cultivo directo de polen aislado, las concentraciones superiores a las mencionadas resultan beneficiosas (Heberle-Bors 1984; Dunwell 1985, Lakshmana Rao y De 1987). Dunwell (1985) relaciona este hecho con la necesidad de una alta presión osmótica que muestran las especies cuyo polen maduro es tricelular (Gramineae, Cruciferae); mientras que aquellas con polen bicelular, requieren menores presiones osmóticas. Sin embargo, en un mismo género (Solanum), las altas concentraciones resultan beneficiosas o inhibitorias, respecto a la inducción de embrioides, según la especie (Powell y Uhrig 1987).

Los niveles altos de sacarosa son efectivos principalmente en las primeras etapas de la embriogénesis, y deben reducirse posteriormente para permitir un buen

desarrollo de los embrioides (Lichter 1982; Heberle-Bors 1985; Dunwell y Thurling 1985). Las altas dosis de sacarosa estimulan la proliferación de callo en general (Ono y Larter 1976); especialmente de callo proveniente de tejidos haploides (Wei et al. 1986; Lakshmana Rao y De 1987), en preferencia al callo de tejidos diploides (Lakshmana Rao y De 1987). Además, los niveles altos de sacarosa aumentan la longevidad del polen (Dunwell y Thurling 1985; Wei et al. 1986; Lakshmana Rao y De 1987), y provocan una mayor inducción de embrioides (Lichter 1982; Dunwell y Thurling 1985; Powell y Uhrig 1987).

Wei et al. (1986), encontraron que la adición de 0,3 M de manitol resultó más efectiva que la sacarosa al 9% para aumentar la longevidad del polen. Sopory (1979) no pudo demostrar un efecto osmótico sobre la inducción de embrioides. En cultivo de anteras de tabaco, un pretratamiento de dos días con estrés osmótico en el medio de cultivo (manitol a 0,5 M), estimula la embriogénesis polínica y la regeneración de plántulas (Imamura y Harada 1980).

2.4.2.2.2 Embriogénesis somática

Aparte del efecto cualitativo de los carbohidratos sobre la embriogénesis somática (Verma y Dougall 1977), éstos ejercen una influencia cuantitativa sobre las diferentes etapas de la misma. Generalmente se utiliza 2-3% de sacarosa.

Las concentraciones superiores a las señaladas favorecen la formación de callo embriogénico en diferentes especies: 4% en Santalum album (Bapat y Rao 1984); 6% en bambú (Yeh y Chang 1987); 6-12% en maíz (Lu et al. 1983; Vasil et al. 1983). La concentración óptima para la inducción de callo embriogénico varía según el medio mineral utilizado (von Arnold y Hakman 1987). Los callos embriogénicos de gramíneas son ricos en almidón (Yeh y Chang 1987).

En algunos casos, los niveles relativamente altos de sacarosa incrementan el número de embriones somáticos (Lu y Thorpe 1987; Engelmann y Dereuddre 1988). Sin embargo, en otros sistemas el aumento de la concentración de sacarosa sobre los niveles normalmente utilizados, disminuye la eficiencia de la embriogénesis somática (Lazzeri et al. 1987; Meijer y Brown 1987). Lu y Thorpe (1987) demostraron un efecto osmótico de las altas concentraciones de azúcar, no así Engelmann y Dereuddre (1988). Un preacondicionamiento con estrés osmótico con altas concentraciones de sacarosa (1.0 M) (Wetherell 1984), o con

0,3 M de manitol (Litz 1987), muestra un efecto beneficioso sobre la eficiencia de la embriogénesis somática. Posiblemente porque el estrés osmótico rompe las conexiones celulares y permite la expresión de la totipotencia de las células (Wetherell 1984), o por la inducción de un aumento de las poliaminas endógenas, las cuales permiten una mayor sincronización y rendimiento de la embriogénesis somática (Litz 1987).

Ammirato y Stewart (1971) demostraron que las altas concentraciones de sacarosa (12%) afectan negativamente el crecimiento de los embriones, debido a la elevación de la presión osmótica del medio (Ammirato y Stewart 1971; Stewart et al. 1975). Sin embargo, en varias especies, la sacarosa a 6% estimula el mejor desarrollo de los embriones (Green 1982; Lu et al. 1983) y evitan la germinación precoz (Vasil et al. 1983).

La germinación de los embriones somáticos requiere sacarosa (Jones 1974), aunque a altas concentraciones (6-12%) puede inhibirse (Green 1982; Lu et al. 1983). La inhibición de la formación de raíces a altas concentraciones de sacarosa puede atribuirse a un efecto osmótico (Lazzeri et al. 1987).

2.4.3 Cultivo de embriones cigóticos

Los embriones cigóticos, cultivados in vitro, pueden asimilar una mayor variedad de carbohidratos que otros tipos de explantes (Raghavan 1980) y su efecto cualitativo varia aún con las especies de un mismo género (Doerpinghaus 1947). A partir de estudios comparativos sobre la utilización de varias fuentes de carbono, se ha concluido que la sacarosa es superior para el crecimiento de embriones in vitro (Burghardtová y Tupy 1980; y trabajos citados por Raghavan 1980). Esta superioridad, especialmente en embriones inmaduros, puede atribuirse a la aparición más temprana de las hidrolasas (UDP- y ADP-sintetasas) respecto a las sintetasas de la sacarosa (Duffus y Rosie 1975).

Las concentraciones óptimas muestran también variaciones según las especies, aún dentro de un mismo género (Sanders 1950, citado por Raghavan 1980). Estas disminuyen, conforme avanza el estado de desarrollo ontogenético de los embriones al momento de la disección (Prêtová 1974; Monnier 1976; Stafford et al. 1979). Los efectos de las altas concentraciones sobre el crecimiento de embriones, se adscribe a la disminución del potencial osmótico (Rietsema et al. 1953; Rabéchault et al. 1974; Stafford et al. 1979). Los resultados de los niveles elevados de sacarosa se reproducen al aumentar la concentración de sales minerales (Raghavan y Torrey 1963;

Monnier 1980), con el uso de sales orgánicas de amonio (Norstog 1967; Mauney et al. 1967); de NaCl (Mauney 1961) o de reguladores osmóticos (Rabéchault et al. 1974; Stafford et al. 1979; Monnier 1980). La concentración óptima de sacarosa es aquella que permite alcanzar un potencial osmótico del embrión in vitro similar al que lo rodea in situ (Wang et al. 1987). La absorción de agua aumenta conforme el potencial osmótico del embrión es más negativo. Los embriones cultivados en concentraciones inferiores y superiores a la óptima, acumulan más y menos agua, respectivamente. Los cambios en la concentración de sacarosa del medio de cultivo, permiten alterar el contenido endógeno de agua de embriones de Pisum, el cual está regulado genéticamente (Wang et al. 1987).

En proembriones y embriones jóvenes las concentraciones altas de sacarosa también inhiben la germinación precoz y deben reducirse progresivamente para permitir la continuación del crecimiento embrionario (Monnier 1980) y evitar la germinación precoz (Cameron-Mills y Duffus 1977). La inhibición de la germinación precoz se asocia al efecto provocado por la reducción del potencial osmótico (Ziebur et al. 1950; Crouch y Sussex 1981; Finkelstein y Crouch 1986). La concentración efectiva del osmoregulador, para la prevención de la germinación precoz, aumenta con la edad del embrión y los embriones maduros no responden aun a altas concentraciones de producto (Finkelstein y Crouch 1986). Algunos autores (Mauney 1961; Monnier 1980; Finkelstein y

Crouch 1986) relacionan estos resultados con las observaciones que muestran una reducción del potencial osmótico, en el fluido ovular que rodea al embrión in situ, a medida que aumenta su desarrollo (Kerr y Anderson 1942; Mauney 1961; Ryczkowski 1960a, 1969; Smith 1973; Yeung y Brown 1982). Estos gradientes físico-fisiológicos se presentan también, en una misma etapa de desarrollo del embrión dada, y avanzan en la dirección del desarrollo del embrión, y comprenden la disminución de la tasa de respiración, disminución de los azúcares solubles (Ryczkowski 1960b, 1978, 1980). Además a medida que el embrión madura, ocurre una disminución del contenido de agua del mismo (deseccación) (Crouch y Sussex 1980).

El ABA produce resultados similares a la disminución del potencial osmótico sobre la germinación precoz (Crouch y Sussex 1981; Morris et al. 1985; Finkelstein y Crouch 1986). Sin embargo, el efecto del potencial osmótico, en el caso de embriones de Brassica napus (Finkelstein y Crouch 1986) y Hordeum (Morris et al. 1988) no se expresa a través de un aumento del nivel endógeno del ABA. En ambos casos se concluye que el desarrollo del embrión no es influenciado directamente por el ABA, sino por la acción de éste sobre la absorción de agua.

2.4.4 Uso de la sacarosa en medios de conservación

La sacarosa y los reguladores osmóticos, además de utilizarse en los medios de crecimiento mínimo (Ver sección 2.2.1), cumplen un papel importante en otros tipos de conservación.

Se ha demostrado que las altas concentraciones de sacarosa mejoran la sobrevivencia de los tejidos cuando éstos se almacenan a temperaturas inferiores a las normales (Westcott 1981a), e inferiores a cero (Nitzsche 1978). Además ejercen un efecto crioprotector cuando se utilizan temperaturas ultrabajas (Hellergren y Li 1972, Leddet 1973, 1974; Monnier y Leddet 1978, 1980, Engelmann et al. 1985; Dereuddre et al. 1988). Otros compuestos osmoreguladores, como el manitol (Duncan y Widholm 1987), o el sorbitol y aminoácidos, como la prolina (Hellergren y Li 1972), ejercen la misma acción que la sacarosa. Según Hellergren y Li (1972) el efecto crioprotector se debe a la plasmólisis celular, causada por el efecto osmótico. Sin embargo, Leddet (1974) y Monnier y Leddet (1980), consideran que esta explicación no es suficiente, y que las altas concentraciones de sacarosa deben causar cambios estructurales en las células. Las concentraciones excesivas (p. ej. 300 g.l^{-1}) no ejercen ningún efecto protector a las temperaturas inferiores a cero (Monnier y Leddet 1980; Dereuddre et al. 1988). Duncan y Widholm (1987) encontraron que el efecto del manitol sobre la protección al

congelamiento se correlaciona con el aumento en el nivel endógeno de prolina, y consideran que cualquier producto que provoque el mismo resultado, puede tener acción crioprotectora. Sin embargo, no en todos los tejidos, un tratamiento con estrés osmótico conlleva un aumento en la prolina (Pritchard *et al.* 1986b).

Las consideraciones anteriores, explican porqué se han utilizado los reguladores osmóticos, en combinación con bajas temperaturas, para el almacenamiento de tejidos *in vitro* (Nitzsche 1978; Roca *et al.* 1980; Schilde-Rentschler *et al.* 1982; Staritsky *et al.* 1986; Wanas 1986). También proveen la explicación de la utilización de altas concentraciones de sacarosa o de reguladores osmóticos como pretratamientos o crioprotectores para el almacenamiento en nitrógeno líquido (Engelmann *et al.* 1985; Bertrand-Desbrunais 1988; Dereuddre *et al.* 1988).

2.5 Microinjerto

El injerto de ápices meristemáticos, descrito por primera vez por Murashige *et al.* (1972), se ha utilizado principalmente para la reconstitución de plantas libres de virus, en los casos en que el cultivo de ápices presenta dificultades (Navarro *et al.* 1975; Alskieff 1977; Alskieff y Villemur 1978). En especies forestales esta técnica se ha usado para la rejuvenecer clones a partir de árboles adultos, no aptos para la reproducción por esquejes

(Franclet 1979; Monteuuis 1986) y para el mejoramiento genético (Ojeda Enciso 1986). En cacao, existen trabajos para la utilización del microinjerto en mejoramiento genético (Villalobos y Aguilar, no publicado). En algunas rosáceas se ha utilizado con el fin de incorporar la capacidad de fijación de nitrógeno a especies que no presentan esta característica. Bruck y Walker (1986), realizaron injertos de embriones cigóticos en varios estados de desarrollo ontogenético con el fin de estudiar la determinación celular.

En resumen, la utilización de la semilla como método de intercambio y conservación de germoplasma de Coffea, aspectos esenciales para los programas de mejoramiento, presenta dificultades. En otras especies tropicales que muestran un comportamiento similar al café, se recomienda el uso del cultivo de embriones cigóticos o somáticos con el fin de reemplazar la semilla para los fines anteriormente citados.

La variación de las concentraciones «normales» (2-3%) de sacarosa ha demostrado afectar el comportamiento de los diferentes tejidos cultivados in vitro. Asimismo, el manitol, utilizado como sustancia osmoreguladora, produce diferentes respuestas según los sistemas utilizados. El microinjerto, hasta ahora, no ha sido aplicado a la conservación de germoplasma in vitro. En café, además de ofrecer una posibilidad para la solución de problemas de plagas (específicamente nematodos), sería de importancia

para el mantenimiento, tanto de embriones cigóticos como somáticos, en estado de arresto del crecimiento.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del ensayo

La presente investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología, del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, CATIE, Turrialba, durante el período de abril 1988 a enero 1989.

3.2 Material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de Coffea canephora Pierre ex Froehner 'Robusta' y de C. arabica 'Caturra'. Las semillas se obtuvieron del Beneficio del CATIE, donde se les sometió al proceso de rutina previo al almacenamiento, a saber: despulpado, lavado y secado, hasta un contenido de humedad de aproximadamente 20%; luego se almacenaron a 90% H.R y 15°C. En la Unidad de Biotecnología se procedió a despergaminarlas. Posteriormente, se les sumergió en agua durante 2 a 3 días, con el propósito de suavizar el endosperma y facilitar la extracción del embrión.

3.3 Desinfección de las semillas

Para tal fin las semillas se sumergieron durante 1 minuto en alcohol de 70° y, posteriormente, en una solución de hipoclorito de calcio ($6-7 \text{ g.l}^{-1}$ de cloro disponible) durante 30 minutos. En la campana de flujo laminar se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y se procedió a la disección del embrión.

3.4 Medios de cultivo

Se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (1962), modificado según los experimentos. En todos los casos en que se cultivaron embriones cigóticos se agregó cisteína-HCl a una concentración de 25 mg.l^{-1} , como antioxidante. El medio de cultivo se solidificó con 8 g.l^{-1} de agar, agregado al medio antes de ajustar el pH. El pH se ajustó con NaOH 0,1 N, antes de esterilizar los medios en autoclave durante 20 minutos, a una temperatura de 121°C y una presión de $1,1 \text{ Kg.cm}^{-2}$. Para todos los experimentos se utilizaron tubos de vidrio de $8 \times 3 \text{ cm}$, con capacidad para 30 ml. En cada uno de ellos se vertieron 15 ml de medio. La sacarosa se esterilizó con el resto de los componentes del medio.

En el experimento de microinjertos, para la obtención de plántulas a utilizar como portainjertos, los embriones se cultivaron inicialmente en un medio de MS más 100 mg.l^{-1} de inositol, 10 mg.l^{-1} de tiamina, 25 mg.l^{-1} de cisteína-HCl,

azúcar comercial refinada a 30 g.l^{-1} , y 1 mg.l^{-1} de BA. Sin embargo, con el fin de obtener plántulas adecuadas para la realización de los injertos, posteriormente se debió realizar una prueba de medios de cultivo con diferentes concentraciones de ANA (0 y $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) y BA (0 y $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) y sus combinaciones, con un total de 4 tratamientos. Para este efecto, el medio basal de Murashige y Skoog (macro, microelementos y vitaminas) se diluyó a la mitad, y se adicionaron 15 g.l^{-1} de sacarosa.

Las plántulas injertadas se cultivaron en un medio basal de MS más 30 g.l^{-1} de sacarosa sin reguladores del crecimiento.

Para el ensayo inicial sobre el efecto de la sacarosa con diferentes concentraciones de manitol, sobre el crecimiento y la inhibición de la germinación de embriones de *C. canephora*, se utilizó un medio basal MS. En este medio se variaron las concentraciones de sacarosa y de manitol, manteniendo siempre una concentración final de $0,1 \text{ M}$ de azúcares osmóticamente activos (Cuadro 1).

En el segundo experimento sobre el efecto de la sacarosa y el manitol se utilizó un ámbito más amplio en la concentración de sacarosa y manitol, con un total de 36 tratamientos. El medio basal utilizado fue el de Murashige y Skoog completo sin reguladores del crecimiento. Este medio se modificó con las concentraciones de sacarosa y manitol que se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Concentraciones de sacarosa y manitol utilizadas en el ensayo inicial sobre el crecimiento y germinación de embriones de C. canephora.

Sacarosa (moles.l ⁻¹)	Manitol (moles.l ⁻¹)
0,100	0,000
0,075	0,025
0,050	0,050
0,025	0,075
0,000	0,100

Cuadro 2. Concentraciones de sacarosa y manitol utilizadas en el segundo ensayo de crecimiento e inhibición de la germinación de embriones cigóticos de C. canephora.

Niveles de sacarosa (%)	Niveles de manitol (%)
0	0,0
2	0,2
4	0,6
8	1,2
12	2,0
18	3,0

Los potenciales osmóticos teóricos de los medios de cultivo utilizados se calcularon según la fórmula de Vant'Hoff (citada por Salisbury y Ross 1969): $-\psi_m = miRT$; donde: m = molaridad; i = factor de ionización (para sacarosa y manitol es igual a 1); R = constante de los gases (0,0821 litro atm.mol⁻¹.°K⁻¹) y T = temperatura absoluta (298°K a 25°C). Los valores se calcularon en atmósferas y se transformaron a bares con el factor de conversión 1 atm = 1,01325 bares. Para convertir los bares a megapascuales (MPa), en el Sistema Internacional de Unidades, se utilizó la conversión: 1 bar = 0,1 MPa. El valor total del potencial osmótico de los medios de cultivo se calcularon con base en los valores obtenidos para las soluciones de sacarosa y manitol (Cuadros 3 y 4), a lo cual se sumó un potencial osmótico teórico del medio basal de Murashige y Skoog sin sacarosa de -2,11 bares. Este valor se obtuvo del promedio de los valores suministrados por Ammirato y Stewart (1971) de -1,92 bares y de -2,33 bares, medido por Yoshida et al. (1973).

3.5 Aislamiento y cultivo de los embriones

Los embriones se separaron de la semilla y se sumergieron durante 15 minutos en una solución de cisteína-HCl a 100 mg.l^{-1} para evitar la oxidación. Posteriormente se colocaron en el medio de cultivo, a razón de un embrión por tubo de ensayo.

3.6 Microinjerto

3.6.1 Obtención y preparación de las yemas

Cuando se injertaron embriones cigóticos, se utilizaron embriones maduros de C. canephora 'Robusta' y de C. arabica 'Caturra' como yemas. Para los injertos con embriones somáticos, éstos se obtuvieron del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, a partir de explantes foliares de C. canephora 'Robusta'. A los embriones utilizados como yema se les realizó un corte a bisel en uno o ambos lados, de manera que pudiese empatar con el portainjerto

3.6.2 Preparación del portainjerto

Cuando la plántula a utilizar como portainjerto mostró sus cotiledones abiertos y su raíz principal alcanzó una longitud aproximada de 1 cm, se extrajo del tubo de ensayo y se procedió a realizar el

injerto. El portainjerto se decapitó a nivel de hipocotilo y en el tallo se realizó una incisión longitudinal con un bisturí estéril, a fin de facilitar la inserción del embrión cigótico o somático a utilizar como yema. A la plántula se le realizó una poda de raíces.

3.6.3 Realización del microinjerto

Se utilizó una variación del injerto hipocotiledonar, utilizado comúnmente para injertos de café in vivo, y modificado por Danquechín-Derval (1983) para microinjerto de embriones somáticos.

La yema se insertó en la incisión vertical del portainjerto, por medio de una pinza estéril, y se aplicó presión con una aguja de disección para mantener en contacto los tejidos de ambos componentes.

3.7 Condiciones de crecimiento de los tejidos cultivados

Posteriormente a la siembra, los embriones y los demás tejidos cultivados, se colocaron en cámaras de crecimiento, con un fotoperíodo de 16 horas, y una intensidad lumínica de 2000 lux, proporcionada con lámparas fluorescentes. La temperatura fue de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el día y $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la noche.

3.8 Análisis de los datos

El segundo experimento sobre el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de embriones de *C. canephora*, se diseñó como un factorial, con dos factores (sacarosa y manitol) con 6 niveles cada uno (Cuadro 3), para un total de 36 tratamientos. Se sembraron 13 embriones por tratamiento, y se analizaron ocho al azar. Se realizaron dos repeticiones con un mes de diferencia. Los datos de crecimiento se tomaron a los 15 días de sembrados los embriones y se analizaron como un diseño completamente al azar.

3.9 Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la formación de raíces in vitro de embriones cigóticos

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (0,2,4,8,12 y 18%) sobre la formación de raíces. Los datos se tomaron a los 30 días de cultivo. Se midió el número de embriones con raíces bien formadas (con raíces secundarias) en cada tratamiento. Se sembraron 20 embriones por tratamiento.

3.10 Efecto de las bajas y altas concentraciones de sacarosa sobre la germinación de embriones cigóticos de C. canephora

Se evaluó el efecto de la ausencia de sacarosa, y de las concentraciones de ésta (12 y 18 %) sobre la germinación de embriones cigóticos a los 15, 60 y 90 días de cultivo. Luego los embriones que permanecieron en estado de inhibición se transplantaron a un medio con 2% de sacarosa, con el fin de evaluar si el efecto de inhibición era temporal.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo in vitro de semillas de C. canephora 'Robusta' y C. arabica 'Caturra'

La emergencia de la radícula en semillas cultivadas in vitro se presentó después de 10-15 días de cultivo. Sin embargo, hasta los 35-40 días se observó la salida de los cotiledones y posteriormente la elongación del hipocotilo. En total se requirieron entre 45 y 55 días para obtener una plántula bien desarrollada.

El porcentaje total de cultivos de semillas contaminados fue de 35%. El porcentaje de oxidación, considerado como el número de cultivos que presentaban coloración oscura, fue mayor en C. canephora (60%) que en C. arabica (30%). En algunos casos, se observaron plántulas con cotiledones etiolados e hipocotilo de color rojo. Esto ocurrió con mayor frecuencia cuando las semillas se cultivaron a la oscuridad. En estas condiciones también ocurrió una mayor elongación del hipocotilo antes de la expansión de los cotiledones.

4.2 Cultivo de embriones cigóticos aislados

Aunque todos los embriones provenían de semillas maduras, se presentó gran variabilidad de tamaños: de 2 a 6 mm. Esta variación fue más pronunciada en C. canephora. Por ende, para el cultivo in vitro, debieron escogerse los embriones de 4-5 mm de longitud. Con baja frecuencia, y en mayor grado en 'Caturra', se observó la presencia de dos embriones por semilla (poliembrionía). Algunas veces se presentaron más de dos cotiledones por embrión. Para el cultivo in vitro se desecharon los embriones provenientes de semillas poliembriónicas y aquellos con deformaciones.

El porcentaje de cultivos de embriones contaminados fue de 3%; ésta se presentó, generalmente, después de largos periodos de cultivo.

Los embriones cultivados en los mismos medios que las semillas, mostraron deformaciones en los cotiledones. Generalmente, uno de ellos se expandió más que el otro. Fue evidente que cuando uno de los cotiledones se desarrolló en contacto con el medio de cultivo, permaneció más pequeño y de un color verde más claro que el otro. En todos los casos estudiados, las plántulas provenientes de embriones aislados, mostraron un crecimiento menos vigoroso que las provenientes de semilla.

Por el alto porcentaje de contaminación, oxidación y retraso en la obtención de plántulas a partir de semillas, se decidió utilizar los embriones aislados para la obtención de patrones a utilizar en el microinjerto, a pesar de que las plántulas provenientes de semilla tuvieron un hipocotilo más grueso.

4.3 Medios de cultivo para embriones

En el medio utilizado inicialmente para el cultivo de embriones se inhibió la diferenciación de la radícula y en algunos casos ésta mostró un crecimiento desproporcionado con relación al desarrollo del hipocotilo y la parte aérea. Por tal motivo, y con el fin de obtener plántulas más vigorosas para utilizarlas como patrones, se realizó el ensayo con medios de cultivo con diferentes concentraciones de hormonas (Sección 3.4).

En el medio sin reguladores del crecimiento, se desarrolló tanto la parte radicular como la parte aérea. En el medio con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de BA y sin AIA, se desarrolló principalmente la parte aérea, mientras que se inhibió el desarrollo del sistema radicular. En el medio con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIA y sin BA, se presentó la formación de callo abundante en la parte basal del embrión en la interfase del

medio, así como de numerosas raíces anormalmente engrosadas y, algunas veces, clorofílicas. Estas salieron en forma de "palmilla" y la parte radicular no fue conspicua. Se consideró como normal el sistema radicular compuesto por una raíz pivotante y raíces secundarias desarrolladas a partir de ésta. En el medio con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de BA y ANA, se formó gran cantidad de callo y un sistema radical anormal, en ambos cultivares. En los embriones de 'Robusta', la frecuencia de callo, en la interfase del medio de cultivo alcanzó 90% de los embriones cultivados. En este cultivar también se formaron numerosos embriones somáticos a partir de dicho callo. Las plántulas de C. canephora, desarrolladas en este medio, fueron alargadas, con entrenudos grandes y numerosos pares de hojas. En 'Caturra' la elongación de la plántula no fue tan evidente como en 'Robusta'.

Para el cultivo de los embriones a utilizar como portainjertos se decidió usar el medio MS sin diluir y sin reguladores del crecimiento, aumentando la concentración de las sales a 1X.

4.4 Embriogénesis somática

A partir de los embriones cigóticos de C. canephora, cultivados en el medio MS 0,5X o 1X, más 0,5 mg.l⁻¹ de BA y ANA, se observó formación de gran número de embriones adventicios (Fig. 1). Estos a su vez dieron origen, en muchos casos, a más embriones somáticos provenientes del hipocotilo de los anteriores. A los 3 meses de cultivo, sin transferencia de medio, se observó que gran número de embriones somáticos desarrollaron plántulas aparentemente normales. Con frecuencia, los embriones somáticos obtenidos presentaron un mayor desarrollo de la parte aérea en relación al sistema radicular. En los embriones cigóticos de 'Caturra' no se observó formación de embriones somáticos.

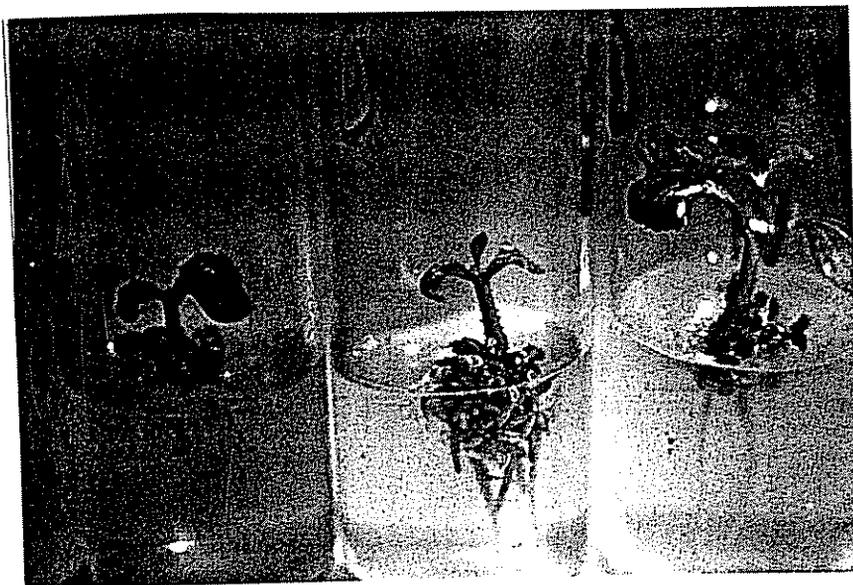


Figura 1. Embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de C. canephora.

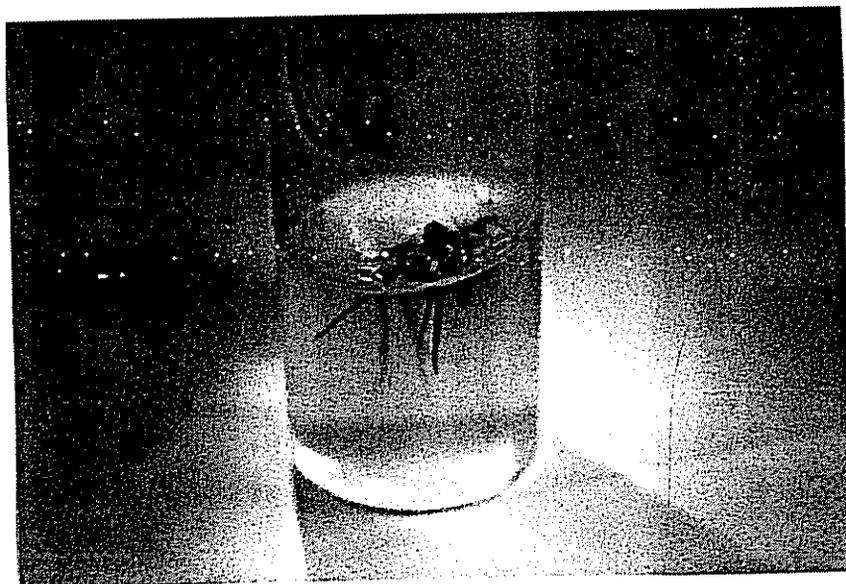


Figura 2. Diferenciación de raíces y embriones somáticos a partir de explantes foliares de plántulas de C. canephora.

4.5 Organogénesis de raíces y embriogénesis somática

Con el fin de obtener más embriones somáticos de *C. canephora* para utilizarlos como yemas en los microinjertos, y para los ensayos con inhibidores osmóticos, se tomaron varias partes de las plántulas desarrolladas en el medio con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA y BA (cotiledones, hojas, nudos, entrenudos -microestacas-) y se transfirieron a un medio de la misma composición. Las hojas se seccionaron en tres partes iguales, a saber: basal, media y distal y se colocaron sobre el envés o el haz sobre el medio de cultivo.

En todos los segmentos de hojas y cotiledones cultivados, se desarrollaron dos tipos de callo. Uno de ellos fue blanco y de aspecto algodonoso, el otro de color crema. A partir de ambos tipos de callo se originó un gran número de raíces (Fig. 2). Algunas de ellas fueron clorofilicas y con geotropismo negativo. En el segundo tipo de callo se formó gran número de embriones somáticos, los cuales permanecieron blancos translúcidos y no mostraron ningún desarrollo posterior. Ambos tipos de callo se formaron sobre un mismo explante.

4.6 Microinjerto

4.6.1 Embriones cigóticos como yemas

Cuando los embriones cigóticos utilizados como yemas ("Caturra" o "Robusta") se cultivaron por algunos días en el medio básico sin hormonas, con el fin de obtener una pequeña plántula, se presentaron algunos problemas debido al poco grosor del patrón para soportar el explante. Este problema no ocurrió cuando se injertaron embriones recién aislados o con yemas apicales de microestacas. La Fig. 3 muestra el aspecto de los microinjertos luego de 2 meses de cultivo.

4.6.2 Embriones somáticos como yemas

Los embriones somáticos utilizados como yemas provenían de cultivos en los cuales los embriones habían permanecido albinos, por cuanto se habían cultivado en recipientes con tapas de aluminio. Estos embriones, al mes de injertados mostraron un color verde, aunque posteriormente no mostraron ningún crecimiento (Fig. 4).

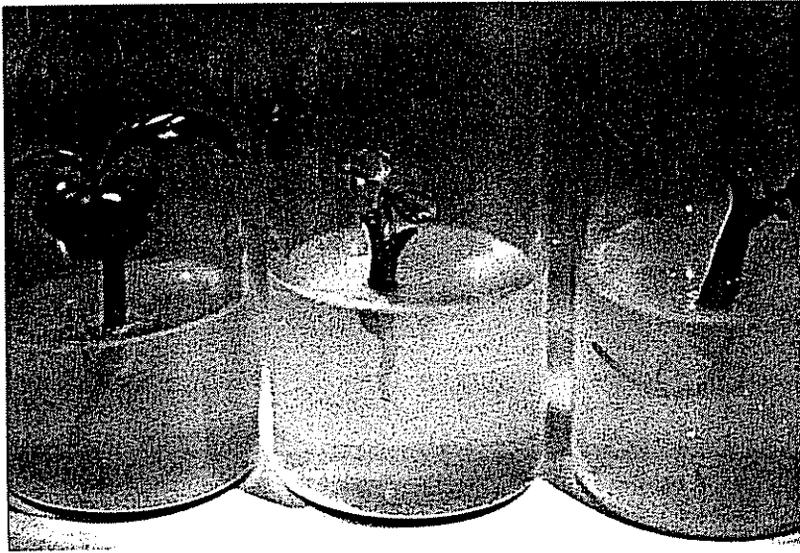


Figura 3. Microinjerto de embriones de C. canephora con embriones cigóticos de C. canephora (a) y de C. arabica 'Caturra' y embriones somáticos de C. canephora (b) a los 2 meses de cultivo.

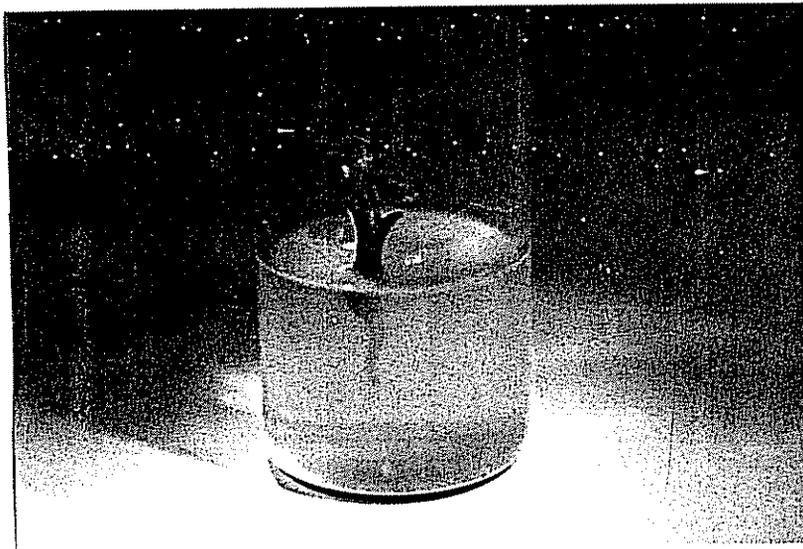


Figura 4. Microinjerto de un embrión cigótico de C. canephora con un embrión somático de C. canephora.

Durante la operación del injerto, cuando se utilizaron embriones cigóticos como patrones se presentaron algunos problemas, como la formación de una herida demasiado grande y volcamiento de una parte de la herida. En ocasiones, solo una parte de la yema permaneció en contacto con el patrón. Sin embargo, aún en estos casos, la yema permaneció verde y mostró algún crecimiento. No se presentaron problemas de oxidación.

4.7 Efecto de la variación del potencial osmótico sobre el crecimiento y germinación de embriones cigóticos de C. canephora

La presión osmótica del medio de cultivo, con una concentración original de 0,1 M de sacarosa se varió, incrementando los niveles de manitol para obtener concentraciones equivalentes a 0,1 M de sacarosa. En este caso, no se obtuvo ningún retraso en la germinación, lo cual era una de las finalidades del ensayo. Sin embargo, se decidió estudiar la influencia de la variación de la presión osmótica sobre el desarrollo de la parte aérea y parte radicular. Los datos de crecimiento, expresados en peso seco y peso fresco, presentaron un coeficiente de variación muy alto (50%) por lo que no fueron analizados estadísticamente. Sin embargo, se pudo observar que conforme aumentó la presión osmótica del medio, los

cotiledones mostraron un mayor desarrollo y un color verde más intenso. También se observó un mayor número de raíces, conforme se aumentó la concentración de manitol.

Debido a que en ningún caso se observó inhibición de la germinación, se diseñó un experimento con un ámbito más amplio de concentraciones de sacarosa y manitol.

4.8 Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de los embriones

4.8.1 Potenciales osmóticos teóricos de los medios de cultivo utilizados en el presente ensayo

Los potenciales osmóticos teóricos de los medios de cultivo utilizados en el presente ensayo se pueden apreciar en los Cuadros 3,4 y 5.

Cuadro 3. Potenciales osmóticos calculados de los medios con sacarosa utilizados en ensayos con embriones de C. canephora.

Concentración de sacarosa (%)	Concentración molar (moles.litro ⁻¹)	Potencial ¹ osmótico de la solución (bares)	Potencial osmótico del medio (bares) ²
0	-	-	-2.11 ³
2	0.058	-1.45	-3.66
4	0.117	2.89	-5.00
8	0.237	-5.79	-7.90
12	0.351	-8.69	-10.80
18	0.526	-13.04	-15.15

¹ $\Pi_{os} = -MRT = -M \times 24.79$ bares

M = Molaridad

R = Constante de los gases (0.083 litro.bar x mol⁻¹.°K⁻¹)

T = T absoluta (298°K a 25°C)

² En el Sistema Internacional de Unidades, 1 bar = 0.1 MPa

³ Valor promedio de -1.92 bares (Ammirato y Steward (1971) y -2.3 bares (Yoshida et al. 1973).

Cuadro 4. Potenciales osmóticos calculados de los medios con manitol utilizados en ensayos con embriones de C. canephora.

Concentración de manitol (%)	Concentración molar (moles.litro ⁻¹)	Potencial osmótico de la solución (bares)	Potencial osmótico del medio (bares)
0	-	-	-2.11
0.2	0.011	-0.27	-2.37
0.6	0.033	-0.82	-2.93
1.2	0.066	-1.63	-3.73
2.0	0.110	-2.72	-4.83
3.0	0.165	-4.08	-6.19

Cuadro 5. Potenciales osmóticos calculados (en bares) de los medios de cultivo utilizados con embriones de C. canephora

Manitol (%)	Sacarosa (%)					
	0	2	4	8	12	18
0	-2.11	-3.66	-5.00	-7.90	-10.80	-15.15
0.2	-2.37	-6.03	-7.37	-10.27	-13.17	-17.42
0.6	-2.93	-6.59	-7.93	-10.83	-13.73	-18.08
1.2	-3.73	-7.39	-8.73	-11.63	-14.53	-18.98
2.0	-4.83	-8.49	-9.83	-12.73	-15.63	-20.46
3.0	-6.19	-9.85	-11.19	-14.09	-16.99	-21.24

4.8.2 Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de los embriones cigóticos de C. canephora

Los datos de este ensayo se analizaron como un diseño completamente al azar, ya que la diferencia entre las dos repeticiones no fue significativa.

En la primera repetición del tratamiento con 0% de sacarosa y 0,6% de manitol, se observó un engrosamiento anormal de la parte basal del embrión en contacto con el medio de cultivo y un desarrollo atípico de los cotiledones. Sin embargo, este resultado no se presentó en la segunda repetición.

En el medio sin sacarosa y sin manitol se observó un alto porcentaje de muerte de explantes, desde los 8 primeros días de cultivo (Fig.5a). Por esta razón, se sembraron 10 embriones en cada uno de los medios con 0% de sacarosa y varias concentraciones de manitol, con el fin de evaluar el efecto de éste sobre la sobrevivencia de los embriones. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 6.

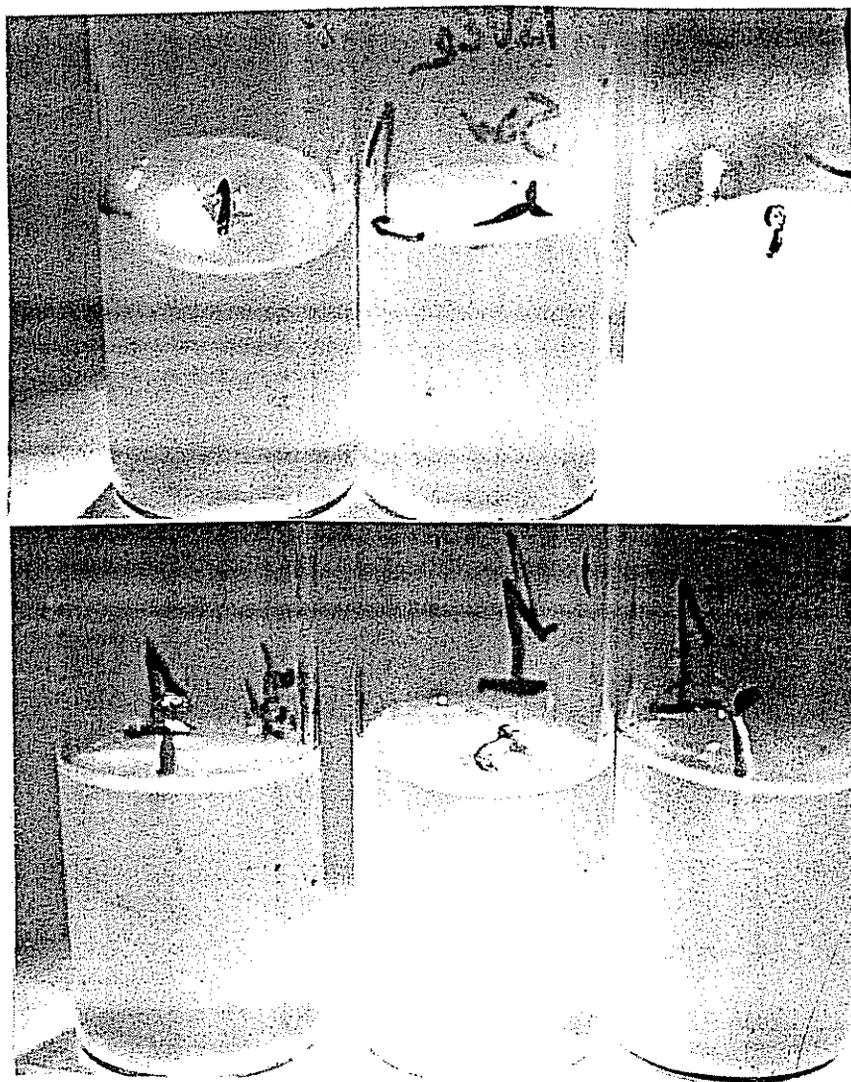


Figura 5. Embriones de *C. canophora* luego de 3 meses de cultivo en un medio con 0% de sacarosa y 0% de manitol. (a) Embriones muertos
(b) Embriones con buen desarrollo de la parte aérea

Cuadro 6. Embriones muertos después de 15 días de cultivo en medios con 0% de sacarosa y varias concentraciones de manitol.

Concentración de manitol %	Total Embriones analizados	Embriones muertos	
		Total	%
0	10	7	70
0.2	10	4	40
0.6	10	4	40
1.2	10	2	20
2.0	10	1	10
3.0	10	1	10

En las Figs. 6 y 7 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de los embriones, expresado como peso fresco y seco respectivamente, a los 15 días de cultivo. El mayor aumento de peso fresco se obtuvo con 2% sacarosa y 1,2% manitol, seguido por el tratamiento con 2% sacarosa y 0% de manitol. El mayor aumento de peso seco se obtuvo con 4% sacarosa y 0,2% manitol, seguido por el tratamiento con 0% sacarosa y 3% manitol.

En la Figura 8 se observa el efecto del aumento de la presión osmótica del medio con diferentes concentraciones de manitol a un medio con 0% de sacarosa. La concentración óptima de sacarosa para el crecimiento de embriones fue 2%, cuando se utilizó 0; 0,6; 1,2 y 2% de manitol. Sin embargo, con 3% de manitol, la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento fue de 0%.

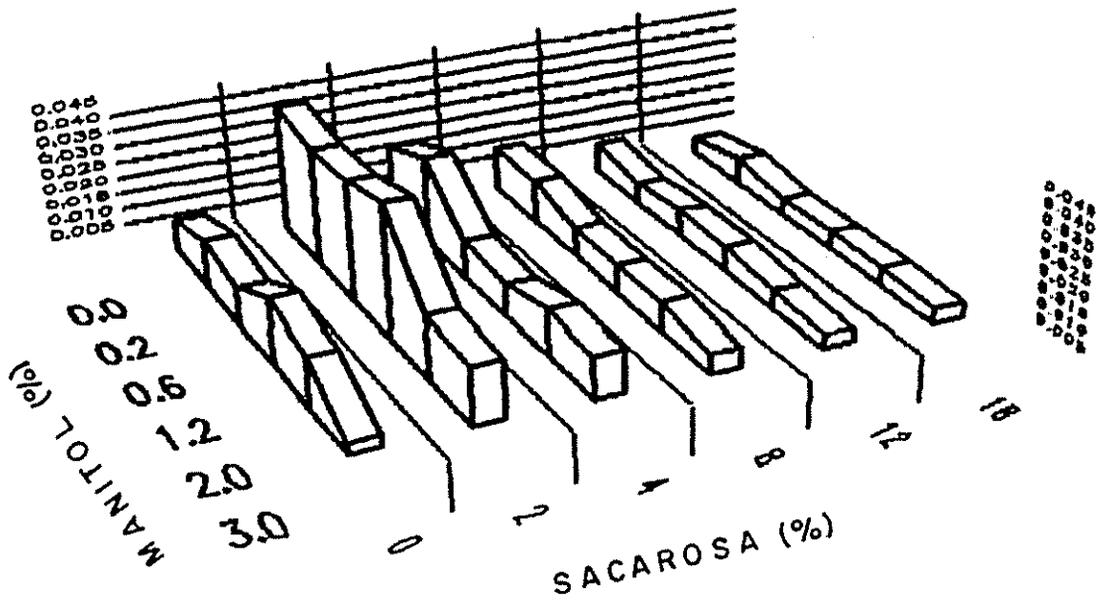


Fig. 6. Efecto de diferentes concentraciones de manitol y sacarosa sobre el peso fresco de embriones de C. canephora a los 15 días de cultivo.

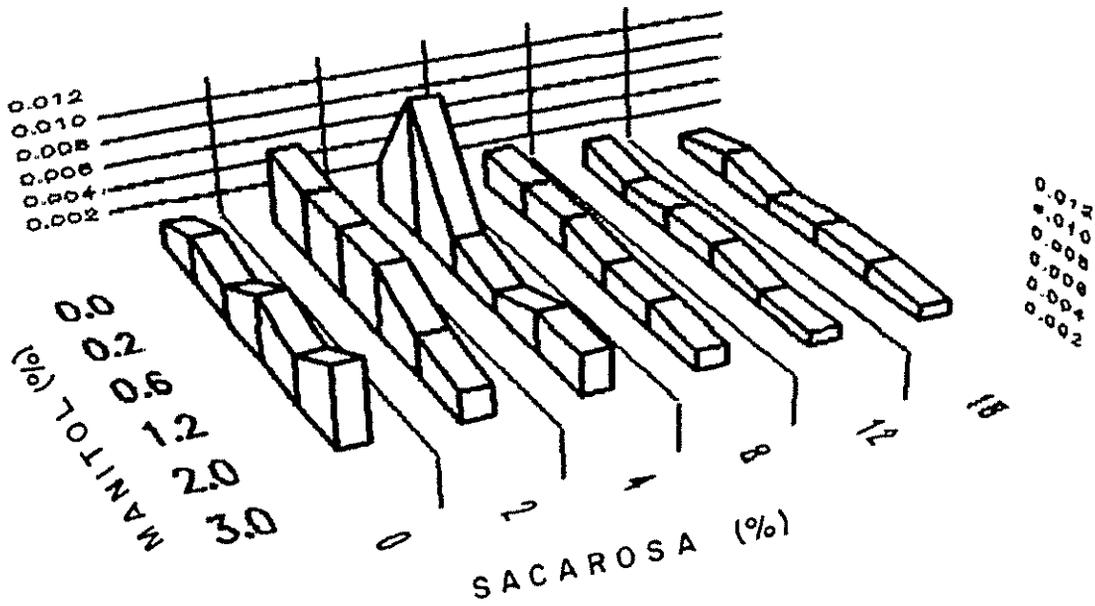


Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de manitol y sacarosa sobre el peso seco de embriones de C. canephora a los 15 días de cultivo.

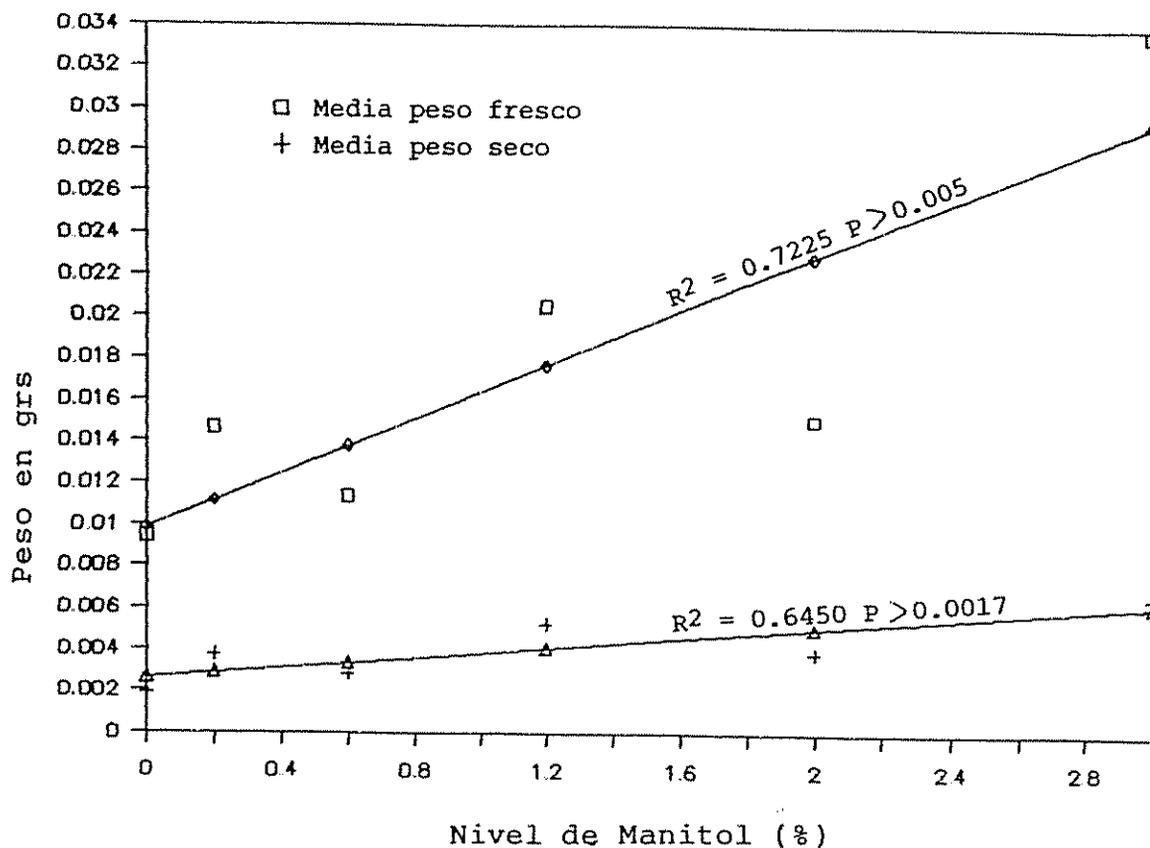


Fig. 8. Efecto del manitol con 0% de sacarosa sobre el crecimiento de embriones aislados de C. canephora.

4.8.3 Formación y desarrollo de raíces

En el Cuadro 7 se observa el efecto de diferentes concentraciones de manitol sobre la formación de raíces de embriones cigóticos de C. canephora. Se observa que, en ausencia de sacarosa, no se formaron raíces. Sin embargo, a 2 y 4% de sacarosa se obtuvo el mayor porcentaje de embriones con raíces. Este disminuyó de nuevo a concentraciones altas de sacarosa. A 12 y 18% de sacarosa, el enraizamiento se inhibió completamente.

Cuadro 7. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la formación de raíces de embriones cigóticos de C. canephora a los 30 días de cultivo

Nivel de sacarosa %	Total embriones analizados	Embriones enraizados	
		Total	%
0	20	0	0
2	20	16	80
4	20	20	100
8	20	14	70
12	20	2	1
18	20	0	0

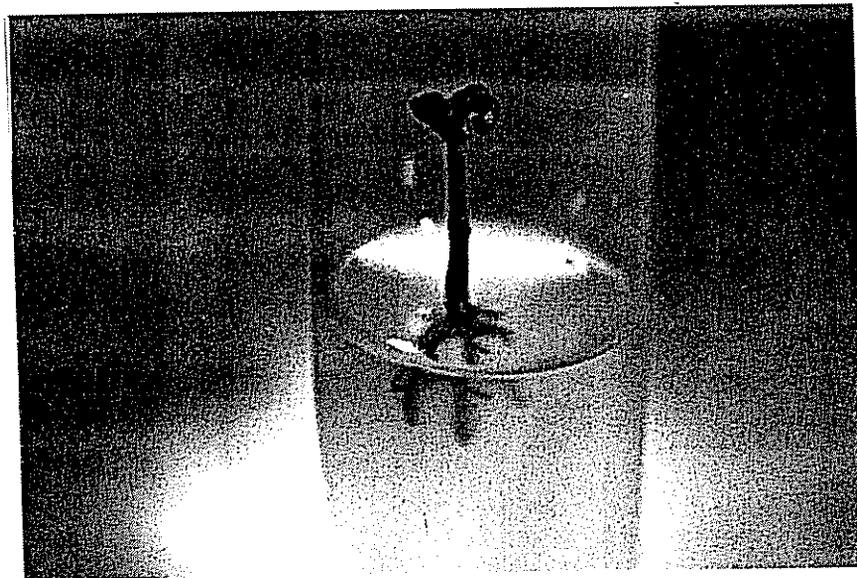


Figura 9. Embrión enraizado de C. canephora en un medio con 8% de sacarosa y 0% de manitol después de 30 días de cultivo

4.8.4 Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre la germinación de embriones de *C. canephora*.

En el Cuadro 8 se observa que en ausencia de sacarosa no se presentó emergencia de la radícula. Sin embargo, en todos los medios con 0% de sacarosa, el hipocotilo mostró elongación, los cotiledones se abrieron normalmente, y tomaron un color verde pálido.

En los medios con 12% de sacarosa, la germinación (emergencia de la radícula) se inhibió, los cotiledones no se expandieron, pero presentaron un color verde pálido. En los medios con 18% de sacarosa, los embriones permanecieron blancos, de aspecto similar al que presentaron cuando se extrajeron de la semilla. A los 3 meses de cultivo, algunos embriones presentaban signos de oxidación en la base.

En el Cuadro 9 se observa el porcentaje de germinación cuando, luego de tres meses de cultivo se transplantaron a un medio con 2% de sacarosa.

Cuadro 8. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre la germinación de embriones cigóticos de C. canephora ¹

Sacarosa (%)	0			12			18		
	15	60	90	15	60	90	15	60	90
Manitol (%)									
0.0	-	-	-	0	2	3	0	0	0
0.2	0	0	0	0	1	2	0	0	0
0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.2	0	0	0	0	1	1	0	0	0
2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1/ Con base en 20 embriones analizados por tratamiento



Figura 10. Embrión de C. canephora luego de 4 meses de cultivo en un medio con 12% de sacarosa y 3% de manitol.



Figura 11. Embrión de C. canephora luego de 4 meses de cultivo en un medio con 18% de sacarosa y 0% de manitol.

Cuadro 9. Embriones germinados en un medio al 2% de sacarosa¹ luego de cultivarse bajo condiciones específicas

Sacarosa (%)	0			12			18		
Días	15	22	30	15	22	30	15	22	30
Manitol (%)									
0.0	-	8	9	9	10	10	10	8	9
0.2	7	9	10	10	10	9	8	9	10
0.6	10	9	9	9	9	10	10	10	9
1.2	9	8	10	10	10	10	10	8	8
2.0	10	10	10	10	10	10	10	9	9
3.0	10	10	7	8	9	10	10	10	9

¹ Datos provenientes de 10 embriones cultivados en los medios y durante los días indicados. Los datos se tomaron a los 30 días de cultivo.

5. DISCUSION

5.1 Cultivo in vitro de semillas y embriones aislados

La germinación más lenta de las semillas, en comparación con la de los embriones aislados, concuerda con las observaciones que adscriben a algunas partes de la semilla, un retraso en la germinación (Bendaña 1962b; Huxley 1964; Velasco y Gutiérrez 1974; Valio 1976). Franco (1946), observó que en un medio aséptico, las semillas cultivadas con el endocarpo (pergamino), germinaban menos que aquellas sin él. Algunos autores atribuyen este hecho a la presencia, en el endocarpo, de un inhibidor, semejante al ácido abscísico (Velasco y Gutiérrez 1976), pero no idéntico a éste (Valio 1976). Sin embargo, Huxley (1964a) considera que el efecto negativo del pergamino, se debe a la obstrucción que opone a la difusión de oxígeno. Varios trabajos demuestran que los ácidos abscísico y giberélico inhiben la germinación de la semilla de café (Maestri y Vieira 1961; Gopal y Ramaiah 1971; Valio 1976), mientras que la cinetina revierte esta inhibición. Valio (1976) sugiere que un alto porcentaje de germinación se relaciona con un bajo contenido de ácido abscísico y giberélico y con altos niveles de citocininas. En el presente ensayo, cuando se

utilizó BA (0,5 y 1 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo de embriones aislados, se inhibe la emergencia de la radícula y se favorece el desarrollo de la parte aérea.

El mayor vigor de las plántulas originadas de semilla, en relación a las provenientes de embriones aislados, demuestra que las sustancias presentes en el endosperma: agua, aminoácidos, proteínas, galactomananas, celulosa, ácido clorogénico y minerales (Dedecca 1958; Wolfron *et al.* 1960; Wolfron y Patin 1964); son necesarias para el crecimiento de la plántula luego de la germinación ya que los minerales y suplementos orgánicos, presentes en el medio de cultivo, no fueron suficientes para el desarrollo de una plántula igualmente vigorosa a la proveniente de semilla.

El alto porcentaje de oxidación obtenido con las semillas, se debe a la actividad de las polifenoloxidasas, presentes en la semilla de café (Oliveira *et al.* 1976). El mayor porcentaje de oxidación obtenido con semillas de C. canephora, concuerda con la observación generalizada de un mayor contenido de fenoles en esta especie.

En los embriones aislados, el porcentaje de oxidación se redujo considerablemente, con el uso de cisteína-HCl a 25 mg.l⁻¹ en el medio y sumergiendo los embriones en una solución de 100 mg.l⁻¹ del mismo compuesto, antes de colocarlos en el medio.

5.2 Microinjerto

Aunque no se realizaron los estudios histológicos del caso, se supone que en los microinjertos realizados se establecieron las conexiones vasculares entre patrón y yema. Cuando se injertaron embriones cigóticos, recién aislados, de color blanco translúcido o embriones somáticos albinos, al tiempo se tornaron verdes. Esto sugiere la translocación de sustancias provenientes del medio de cultivo a través de conexiones vasculares formadas entre el patrón y la yema. Los eventos secuenciales para la formación de un injerto exitoso y compatible, según Moore (1984), comprenden: a) la cohesión del patrón e injerto, b) la proliferación de callo, y c) la rediferenciación vascular, a partir de las células de este callo. En todos los casos de injertos realizados, la unión mecánica, o cohesión, fue adecuada, lo cual se comprobó al tratar de separar los dos componentes del sistema. Esta cohesión se realizó aún en los casos en que solo una parte de la yema permaneció en contacto con el patrón o portainjerto. De acuerdo con Moore (1984), el contacto directo entre células de ambos componentes no es una condición sine qua non para la obtención de un injerto exitoso. Sin embargo, los investigadores de la escuela británica (Yeoman y colaboradores), si consideran que intervienen procesos de reconocimiento entre las células de ambos componentes (Jeffrey y Yeoman 1983). En los injertos realizados en el presente ensayo, la formación de callo fue

apenas perceptible a simple vista. Los microinjertos permanecieron estables en cuanto a crecimiento y las yemas, ya fuesen embriones cigóticos o somáticos, o brotes apicales provenientes de microestacas, permanecieron vivas y verdes por más de 7 meses. Este lento crecimiento podría deberse a que las conexiones vasculares no fueron completas, o al poco desarrollo de la plántula utilizada como patrón. Para que se establezca la continuidad vascular entre los dos componentes de un injerto, es necesaria la formación de plasmodesmos entre las células del patrón y del injerto. Para ello, los tejidos del patrón deben situarse en posición de perfecta correspondencia con los de la yema, por ejemplo corteza-corteza (Kollmann et al. 1985). Lo anterior puede no haber ocurrido en este caso, debido a las diferencias en grosor, y a las dificultades que se presentaron para mantener la yema sobre el patrón; sobre todo que en algunos casos donde sólo una parte de la yema permaneció en contacto con el patrón. Este método, por tanto, podría utilizarse para la conservación de germoplasma de café, en condiciones de inhibición de crecimiento. Su aplicación sería valiosa en los casos de embriones somáticos o cigóticos inmaduros provenientes de cruces interespecíficos, así como de autopolinizaciones de plantas seleccionadas.

Couturon (1982), sugiere la utilización del método de injerto in vivo de embriones para la recuperación de haploides espontáneos, provenientes de semillas poliembriónicas de C. canephora. En C. arabica, debido a la

frecuencia relativamente alta de semillas poliembriónicas; el microinjerto sería de suma importancia, dado el interés creciente por los híbridos interespecíficos de C. canephora X C. arabica, en la lucha contra la roya (Monaco y Carvalho 1971); para el mejoramiento de la calidad de la bebida de las especies cultivadas en bajas altitudes (Capot 1972), y para la búsqueda de mutantes inducidos, más adaptados a condiciones ambientales específicas (Chinnappa 1968).

5.3 Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y manitol sobre el crecimiento de embriones de C. canephora

5.3.1 Efecto de los azúcares sobre el potencial osmótico

Los potenciales osmóticos teóricos de los medios con sacarosa (Cuadro 5) podrían ser más negativos, debido a la inversión de este azúcar que ocurre durante la esterilización en el autoclave (Helgeson et al. 1972; Thorpe y Meier 1973; Dunwell y Thurling 1985; Singha et al. 1987), la cual contribuye a la disminución del potencial osmótico del medio de cultivo (Rietsema et al. 1953; Dunwell y Thurling 1985). La sacarosa se hidroliza en fructosa y glucosa; ésta última produce un potencial osmótico más negativo que una solución equimolar de sacarosa (Lazzeri et al. 1987). Sin embargo, Rabéchault et al. (1974) detectaron más una degradación que una inversión de sacarosa, como

producto de la esterilización en autoclave. Cress y Johnson (1987) encontraron que el potencial osmótico calculado para soluciones de sacarosa sin esterilizar era menos negativo que el valor real, por lo cual se podría esperar que la disminución producida por la hidrólisis sea compensada por la diferencia que existe entre el valor teórico y el valor real.

Respecto a los potenciales osmóticos de los medios con manitol (Cuadros 4 y 5), podría esperarse que los valores sean menos negativos que los valores teóricos, debido a que Cress y Johnson (1987) encontraron que los potenciales osmóticos de soluciones de manitol, predichos por la ecuación de Vant'Hoff, eran de $-0,5$ y -1 MPa, los valores reales fueron de $-0,45$ y $-0,69$ MPa, respectivamente.

En la presente investigación se utilizaron concentraciones entre 0 y 3% (0,011 a 0,165 M) de manitol. Se ha demostrado que a partir de 0,4-0,5 M, el manitol provoca la plasmólisis incipiente de las células (Adamson 1962; Cande y Ray 1976; Codron *et al.* 1978); por tanto, cuando se utilizan concentraciones superiores a éstas, los tejidos se exponen a un estrés osmótico. Estas concentraciones corresponden a potenciales osmóticos teóricos de $-9,96$ a $-12,46$ bares ($-0,996$ y $-1,2$ MPa). De ahí, que en el presente estudio, en los medios en que se utilizó sólo manitol, posiblemente el efecto de éste fue únicamente la reducción del potencial osmótico del medio de cultivo, pues las concentraciones utilizadas no se

consideran plasmolizantes. Sin embargo, en los medios con 12% de sacarosa más 2 y 3% de manitol y en todos los medios con 18% de sacarosa, los potenciales osmóticos teóricos son inferiores a -15 bares (Cuadro 5), similares a los que alcanza un suelo en condiciones de sequía (Thorpe 1985), y por tanto los embriones cultivados en ellos estarían expuestos a condiciones de estrés osmótico. El uso de la sacarosa, como agente osmótico, presenta la desventaja que no todos los efectos observados pueden atribuirse a la disminución causada en el potencial osmótico, pues parte de ella es metabolizable por los tejidos. Por ejemplo, Kimball *et al.* (1975), en callos de soya, observaron que al disminuir el potencial osmótico de un medio estándar con el aumento de la concentración de sacarosa, el peso seco de los callos fue mayor que cuando se adicionaron cantidades equimolares de sorbitol, manitol o glucosa. Aunque en algunos tejidos el manitol constituye también una fuente de energía, lo es en grado muy bajo, pues su penetración a la célula, en la mayoría de los tejidos de angiospermas estudiados, es mínima (Creelman y Zeevart 1985; Pritchard *et al.* 1986b). En presencia de sacarosa y manitol, éste último sería menos utilizado metabólicamente por los embriones y adicionaría un componente osmótico a la concentración de sacarosa.

5.3.2 Efecto de la sacarosa y el manitol sobre la muerte, longevidad y viabilidad de embriones

El alto porcentaje de mortalidad de los embriones observado en el medio sin sacarosa ni manitol (Fig. 5a; Cuadro 6), no puede atribuirse a la oxidación. Cuando ésta ocurre, el medio también se oscurece, lo cual no ocurrió en los cultivos realizados en el presente estudio. En la literatura, no se citan ejemplos concretos acerca de la influencia de la falta de carbohidratos en la muerte de tejidos cultivados in vitro. Se menciona, sin embargo, que en callos ovulares de Citrus, la eficiencia de la embriogénesis somática aumentó con la edad del callo y la omisión de sacarosa del medio, durante un subcultivo, actuó en forma similar al envejecimiento del callo (Kochba y Button 1974).

La respuesta de los embriones cigóticos observada en los medios sin sacarosa, pueden explicarse por los cambios que ocurren en células cultivadas en medios desprovistos de sacarosa. La falta de sacarosa del medio de cultivo en células de Acer pseudoplatanus, provocó un rápida hidrólisis inicial de la sacarosa endógena y, posteriormente, ésta fue sustituida por la hidrólisis de almidón. En este punto, disminuyeron la reserva de ATP y la tasa de respiración y se incrementó el nivel de fosfato inorgánico (Rébéillé et al. 1985). Cuando casi la totalidad de la reservas de

carbohidratos intracelulares ha desaparecido, se utilizan otras fuentes de carbono para la respiración, como el citoplasma (Journet et al. 1986), y los fosfolípidos componentes de la membrana celular (Roby et al. 1987). Este último fenómeno es un buen indicador de estrés (Roby et al. 1987). También en varios estudios se ha demostrado que la degradación de lípidos de la membrana (lo cual implica una reducción del área total de superficie de membranas y la disolución de organelos), constituye una parte integral del proceso de senescencia (Paliyath et al. 1987). Roby et al. (1987) consideran que la sobrevivencia de las células durante largos períodos sin un suplemento exógeno de carbono orgánico, depende de los niveles endógenos de carbohidratos y de la capacidad para controlar el proceso autofágico. Estas observaciones podrían explicar la diferencia de los resultados del presente ensayo, con embriones cigóticos de C. canephora, y los obtenidos con embriones somáticos de Daucus, por Jones (1974). Estos últimos permanecieron en estado quiescente, pero viables, hasta por dos años en un medio sin sacarosa. Sin embargo, en nuestro caso, los embriones sexuales de C. canephora cultivados en un medio sin sacarosa, mueren rápidamente y sólo un pequeño porcentaje de ellos logra sobrevivir. Como se explicó anteriormente (Sección 5.1), los embriones, aún maduros, mostrarían cierta dependencia de los componentes del endosperma, entre ellos carbohidratos, para crecer; y se podría asumir que su reserva endógena de carbohidratos es

baja, por lo cual no logran sobrevivir a la ausencia de sacarosa del medio. Podría considerarse que dicha diferencia se debe a una menor capacidad de los embriones cigóticos de Coffea para sobrevivir a las condiciones que favorecen la senescencia, en este caso, la ausencia de sacarosa en el medio.

Existen claros ejemplos que muestran el efecto de las altas concentraciones de sacarosa en el retraso de la senescencia, muerte de células (Austruy, citado por Codron *et al.* 1978), de polen (Dunwuell y Thurling 1985) y de embriones haploides (Keller y Armstrong 1978), cultivados *in vitro*. El manitol, a concentraciones no plasmolizantes (0,3-0,4 M) (Codron *et al.* 1978, Wei *et al.* 1986), así como el aumento de la concentración de sales (Codron *et al.* 1978), también aumentan la viabilidad de los tejidos *in vitro*. Los osmoreguladores, como el sorbitol y manitol, ayudan a mantener la formación de callo y la regeneración de plantas en cultivos de suspensión (Kumar *et al.* 1988) y en callos (Kishor y Reddy 1986a,b) a largo plazo. En suspensiones celulares de frutos de Pyrus, la falta de sacarosa, en un medio con 0,37 M de manitol, no es un factor determinante en la senescencia y muerte de las células (Pech y Romani 1979). En base a las observaciones anteriores, puede concluirse que la acción de la sacarosa en el retraso de la senescencia es, al menos en parte, un efecto osmótico, aunque no debe excluirse totalmente un efecto trófico en este aspecto. Por ejemplo, Webb y Armstrong (1983)

encontraron que la adición de sacarosa a las raíces de arroz cultivadas en condiciones de anoxia, provocaron un aumento de la viabilidad y de la tolerancia a la deficiencia de oxígeno. Sin embargo, con manitol o sorbitol la respuesta fue idéntica al medio sin carbohidratos. También, se puede considerar que parte de la función de la sacarosa del medio, para el cultivo de embriones cigóticos de café, es ayudar a mantener la viabilidad de los embriones.

En la presente investigación, la muerte de embriones se redujo considerablemente al aumentar la concentración de manitol (Cuadro 6). Por tanto, la muerte de embriones ocurrida en el medio sin sacarosa ni manitol, podría atribuirse a la falta de un potencial osmótico adecuado para prevenir la senescencia celular. Este proceso fisiológico ocurre cuando los tejidos se cultivan sin auxina (Codron et al. 1978). Según Codron et al. (1978, 1979), la disminución del potencial osmótico evitaría la salida de solutos y ayudaría a mantener la integridad de la célula. Pech y Romani (1979) demostraron que la disminución del potencial osmótico previene la lisis celular que acompaña la senescencia.

Los embriones de C. canephora, cultivados en medios con altos niveles de sacarosa más diferentes concentraciones de manitol, permanecieron en estado quiescente, pero vivos (Figs. 10 y 11). Además los embriones pudieron reanudar su crecimiento, cuando se cultivaron en medios con

concentraciones consideradas como normales (2% de sacarosa). Una posible explicación al hecho de que los embriones a altas concentraciones de sacarosa se mantuvieron viables, podría ser la reducción de la síntesis de etileno que ocurre a bajos potenciales osmóticos. El etileno, así como el ABA estimulan la senescencia de muchos órganos, mientras que las auxinas y, en menor grado, las citocininas, la retrasan (Sacher 1973). A este respecto, Imaseki y Watanabe (1978) encontraron que en segmentos de hipocotilo de Phaseolus aureus la síntesis de etileno se inhibe a una concentración plasmolizante de manitol (0,5 M), inhibe . Resultados similares se obtuvieron con sacarosa y sorbitol, por lo cual la inhibición se adscribió al efecto del estrés osmótico y no al manitol per se. Posiblemente, esta inhibición se debe a la acción del estrés osmótico sobre la membrana celular (Rubinstein 1977), ya que la síntesis de etileno se relaciona, de algún modo, con esta estructura (Imaseki y Watanabe 1978). Sin embargo, la síntesis de etileno no siempre se inhibe con la presencia de manitol. En discos foliares de Citrus, colocados en soluciones de manitol de 0,01 a 0,1 M (concentraciones no plasmolizantes), se observó un incremento en la producción de etileno en las primeras horas de incubación. Este resultado se atribuyó a la acción directa del manitol, quien aparentemente afecta una etapa de la biosíntesis de etileno, y el resultado no pudo reproducirse con otros osmoreguladores (Riov y Yang 1982).

De esta investigación, podría concluirse que parte de la sacarosa del medio de cultivo, juega un papel importante en el retraso de la senescencia de los embriones cultivados in vitro, por su efecto en la disminución del potencial osmótico, aunque no debe excluirse totalmente un efecto trófico de la sacarosa en este aspecto.

Una práctica común en los estudios de crioconservación de tejidos consiste en realizar precultivos en medios con altas concentraciones de sacarosa (en general: 0,5 a 0,75 M) o de polioles (manitol o sorbitol) con el fin de mejorar el porcentaje de sobrevivencia de los tejidos luego de la exposición al nitrógeno líquido. Existe desacuerdo respecto a si el papel de la sacarosa es meramente osmótico (coligativo) o si actúa, al menos parcialmente, a nivel metabólico (Fabre 1986). De acuerdo con los presentes resultados, se podría considerar que la sacarosa participa directamente, al menos en parte, en el retraso de la senescencia de los tejidos. Para una futura aplicación de la crioconservación a los embriones cigóticos de café, debe utilizarse siempre sacarosa, ya que si solamente se provee un substrato no metabolizable (en este caso manitol), se produciría un desgaste de las reservas energéticas de las células, con la consecuente muerte de los embriones.

5.3.3 Crecimiento de los embriones

El aumento observado, tanto en el peso fresco como en el peso seco de embriones cultivados en un medio sin sacarosa, conforme aumentó la concentración de manitol (Fig. 8), podría atribuirse al efecto estimulante que ejerce la disminución del potencial osmótico sobre el crecimiento y no a un efecto nutricional. En la mayoría de los tejidos vegetales de angiospermas, estudiados hasta la fecha, el manitol no constituye una fuente nutricional importante (Thompson y Thorpe 1981; Cram 1984). A partir de varios estudios se concluye que la reducción del potencial osmótico ejerce un mayor estímulo sobre la elongación que sobre la división celular. Adamson (1962), en segmentos de Helianthus tuberosus, cultivados en un medio con auxina y citocinina, demostró que un aumento en la concentración de manitol de 0 a 0,4 M, produce una disminución y aumento progresivos en la expansión y mitosis celulares, respectivamente. En brotes de diferentes especies el aumento del nivel de sacarosa disminuye la concentración de AIA que estimula la elongación (Michel 1968). Kirkham et al. (1972), al disminuir el potencial osmótico del medio con manitol, observaron una disminución en la tasa de división celular. En segmentos de coleoptilo de Pisum, Marré et al. (1973), encontraron que el aumento de la concentración de manitol de 0 a 0,2 M, inhibe progresivamente la división celular. Además, un potencial osmótico más negativo,

estimula el movimiento basípeto de la auxina (Sheldrake 1979). Según la teoría del "crecimiento ácido", propuesta por Cleland y colaboradores (Cleland 1977), la auxina estimula la acidificación de la pared, lo cual a su vez produce una disminución en la rigidez de la misma, y como consecuencia la elongación. Así, el estímulo del crecimiento observado en la presente investigación, conforme aumenta la concentración de manitol, en los medios sin sacarosa, podría atribuirse a un incremento de la elongación celular, más que de la mitosis, como respuesta a la disminución del potencial osmótico. Una prueba de ello fue que los embriones cultivados en medios con manitol, pero sin sacarosa, mostraron elongación del hipocotilo, pero no diferenciación de la raíz. Ruesink et al. (1978), en células de Convolvulus, observaron un leve aumento en la síntesis proteica cuando el manitol del medio se aumentó de 0 a 0,1 M.

Cuando la sacarosa se aumentó a 2 y 4%, el crecimiento de los embriones fue altamente superior al obtenido con sólo manitol (Figs. 6 y 7). El menor crecimiento observado en los medios sin sacarosa, respecto a los medios con 2 y 4% de sacarosa, respaldan la importancia nutricional de la sacarosa como fuente de energía. En células de Acer, cultivadas en un medio sin sacarosa, la hidrólisis de sacarosa endógena fue más rápida que el desdoblamiento de almidón, lo cual induce una deficiencia de carbohidratos para mantener un metabolismo activo (Rébéillé et al. 1985).

Los resultados del presente estudio justifican el empleo generalizado de concentraciones de sacarosa en el ámbito de 2-4% para el cultivo de tejidos, y en especial para embriones maduros de varias especies. El doble papel, nutricional y osmótico, de la sacarosa se ha demostrado en muchos estudios sobre crecimiento de tejidos vegetales. También la sacarosa estimula la elongación celular producida por la auxina, ya que, por su efecto osmótico, incrementa la excreción de protones (acidificación de la pared celular). Varios autores, citados por Inohue et al. (1987); han demostrado desde 1934, que la auxina, al inducir la elongación celular, también estimula la síntesis de polisacáridos no celulósicos de la pared. La producción de polisacáridos fosforilados constituye, según Baker y Ray (1965, citados por Inohue et al. 1987), uno de los mecanismos por los cuales la auxina estimula la pérdida de rigidez de la pared y, por ende, la elongación celular. La sacarosa del medio, en coleóptilos de Avena, provocó un incremento en los niveles de UDP-glucosa, intermediario en la síntesis de polisacáridos constituyentes de la pared celular (Inohue et al. 1987).

A concentraciones altas de sacarosa, el crecimiento de los embriones disminuyó (Figs. 6 y 7). Aún a los 3 meses de cultivo su crecimiento se mantuvo estable. Varios trabajos en otros tejidos cultivados in vitro, dejan suponer que el efecto del aumento de la concentración de sacarosa se debe a la disminución del potencial osmótico y de éste sobre la

reducción del crecimiento celular. Este aspecto se ha demostrado en pruebas con coleóptilos de Avena (Rubinstein 1977) y en varios tejidos cultivados in vitro. Van der Plas y Wagner (1984) observaron que la transferencia de callos de papa, a un medio con 0,3 o 0,5 M de manitol, resultó en una disminución del peso fresco, debido a la salida de agua de los tejidos. En el medio con 0,5 M de manitol, causó una pérdida de cerca del 40% del agua intracelular, lo cual incrementó en 65% la osmolaridad del fluido intracelular. En tejidos expuestos a estrés osmóticos, la disminución en la extensión celular parece ser más pronunciada que la de la división celular. González-Bernáldez et al. (1968), en raíces de Allium encontraron que la elongación celular a -2 bares se redujo en 20% y a -12 bares, en 40%, respecto a los valores obtenidos a 0 bares; mientras que la división celular sólo se redujo en 20% a -12 bares. En callos de soya, Kimball et al. (1975) observaron que al disminuir el potencial osmótico del medio de -2,9 bares a -10,9 bares, con el aumento de la concentración de sacarosa, o la adición de glucosa, manitol o sorbitol, se redujo el tamaño de las células. En suspensiones celulares de Phytolacca, la disminución del potencial osmótico del medio de -2 bares (con una concentración estándar de 0,088 M de sacarosa) a -8 bares (con diferentes concentraciones de manitol) provocó una reducción del volumen celular, mientras que el número de células permaneció prácticamente constante (Sakuta et al. 1987). Sin embargo, en suspensiones celulares de Acer y

Glycine, sujetas a estrés osmótico con 6% de manitol o sorbitol se determinó una reducción en el número de células cercana al 30%, y aunque la extensión también se redujo, esta disminución fue más lenta. El mayor efecto cuantitativo de la disminución del potencial osmótico sobre la elongación se atribuye a la alteración de los fenómenos físicos relacionados con la absorción de agua, mientras que el retraso en el ciclo celular se adscribe a la acción de la hidratación (energía libre disponible) sobre la actividad enzimática conectada con los procesos biosintéticos (González-Bernáldez et al. 1968). Según Pierce y Rasche (1980; citado por Morris et al. 1988), el aumento de los niveles endógenos de ABA que ocurre en condiciones de estrés osmótico disminuye la extensibilidad de la célula y previene la expansión celular y, a su vez, el estímulo de la síntesis de ABA se debe a la pérdida de turgencia de las células producida por el estrés (Creelman y Zeevart 1985).

Existen muchas investigaciones sobre los fenómenos bioquímicos que ocurren a nivel celular, durante la exposición a un estrés osmótico, que podrían explicar la reducción en el crecimiento observada en embriones de Coffea. Sin embargo, las respuestas de los diferentes tejidos varían debido a la plasticidad que éstos, y aún las poblaciones de células dentro de un mismo tejido, muestran respecto al cambio de las condiciones de estrés (ajuste osmótico) (Pritchard et al. 1986a,b). Este ajuste osmótico se ha demostrado en varios sistemas in vitro expuestos a

estrés osmótico, por ejemplo en células de tabaco, y de tomate y en callos de remolacha (trabajos citados por Pritchard et al. 1986 y Hammersley-Straw y Thorpe 1988). Sin embargo, algunas respuestas generalizadas de los tejidos al estrés osmótico podrían explicar esta reducción de crecimiento. Por ejemplo, en callos de tubérculos de papa (Van der Plas y Wagner 1984) y suspensiones celulares de Acer y Glycine (Pritchard et al. 1986b), se ha observado un aumento en la tasa de respiración celular cuando se exponen a estrés osmótico. Este aumento podría indicar una mayor actividad de la vía alterna (menos eficiente energéticamente), como respuesta a una reducción de la disponibilidad de ATP proveniente de la vía de los citocromos (Van der Plas y Wagner 1984) y una necesidad de incrementar la energía disponible para mantener los procesos metabólicos o para la síntesis de ciertos solutos celulares (Pritchard et al. 1986b). Este incremento de la tasa respiratoria, podría indicar una disminución de los procesos biosintéticos necesarios para el crecimiento de la célula. En pruebas con coleoptilos de Avena, la disminución del crecimiento obtenida en condiciones de estrés osmótico (Rubinstein et al. 1977), se acompaña de una disminución en la absorción de aminoácidos, un aumento en la permeabilidad a los iones y de los potenciales eléctricos de la membrana (Rubinstein et al. 1977); lo cual indica que posiblemente los eventos regulados por la membrana (principalmente transporte) sufren alteración.

La acumulación de reservas amiláceas, que ocurre en tejidos expuestos a altas concentraciones de sacarosa (12-15%) (Hammersley-Straw y Thorpe 1988), posiblemente por falta de hidrólisis provocaría una disminución en la disponibilidad de sustancias osmóticamente activas que permitan reducir suficientemente el potencial osmótico (y por tanto el potencial hídrico) de las células de los embriones, que manera que no se llegue a alcanzar el equilibrio con el medio de cultivo, que permita la absorción de agua. Este hecho evitaría la creación de un potencial de turgencia adecuado en las células que permitan su extensión.

Otra posible explicación de la disminución del crecimiento es la acumulación de prolina que ocurre en condiciones de estrés osmótico (Cress y Johnson 1987), ya que se ha demostrado que la aplicación de prolina exógena disminuye el crecimiento de los tejidos (Tal y Katz 1980). Sin embargo, esta acumulación de prolina como respuesta al estrés osmótico, no constituye una respuesta generalizada en todos los tejidos (Pritchard *et al.* 1986b). Asimismo, en varios tejidos se ha demostrado un aumento en los niveles endógenos de ABA como respuesta al estrés osmótico (Wong y Sussex 1980; Creelman y Zeevart 1985; Finkelstein y Crouch 1986). Este regulador del crecimiento actúa como inhibidor del crecimiento.

En varios estudios, se ha utilizado el efecto que ejerce la disminución del potencial osmótico sobre la

reducción del crecimiento de diferentes tejidos para seleccionar líneas de células resistentes al estrés hídrico (Chen et al. 1980; Wong y Sussex 1980). Esta característica también se ha utilizado en el almacenamiento de tejidos a largo plazo (Westcott 1981b; Schilde-Rentschler 1979, Schilde-Rentschler et al. 1982). Por tanto, en embriones cigóticos de café se propone como alternativa para la conservación de germoplasma.

En estudios con crioconservación de tejidos, uno de los propósitos de usar pretratamientos con estrés osmótico es reducir el volumen de las células, lo cual conllevaría una mayor resistencia al congelamiento, posiblemente por la reducción del agua intracelular (Withers 1979). Se ha demostrado que los pretratamientos con estrés osmótico provocan una disminución en el volumen celular (Pritchard et al. 1986a), sin embargo no en todos los tejidos esta reducción se asocia con mayor resistencia al congelamiento (Pritchard et al. 1986c).

A concentraciones superiores a 8% de sacarosa, se observó un estado de quiescencia, luego de 3 meses de cultivo. Estos resultados pueden atribuirse a la reducción del crecimiento observado, producto de la disminución de absorción de agua producida por las altas concentraciones de sacarosa. Dunwell (1981) cuando cultivó embriones de cebada en un amplio ámbito de concentraciones de sacarosa (3 a 12%), observó que el contenido de agua de los embriones fue

inversamente proporcional a la concentración de sacarosa en el medio. Esta limitación en la absorción de agua, podría haber provocado un estado de "dormancia" o "latencia" en los embriones de C. canephora. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en otros tejidos. Takayama y Misawa (1980), en bulbillos de lilium cultivados in vitro encontraron que a una concentración de 9% de sacarosa, los tejidos entran en una especie de "dormancia", la cual es revertida al transplantar los tejidos a un medio con 3% de sacarosa. Barthe y Bulard (1982), encontraron que la presencia de sacarosa en el medio de cultivo aumentó el período de latencia de embriones de Pyrus, y una concentración del 2% resultó más efectiva que al 1%.

A partir de los diferentes efectos de la sacarosa sobre los mecanismos celulares que inducen el crecimiento, queda claro la necesidad de la presencia de este carbohidrato como fuente energética y agente osmótico. En el presente experimento se demostró que la presencia de sacarosa estimula tanto el peso fresco como el peso seco de los embriones, a concentraciones consideradas normales por la literatura.

5.3.4 Formación de raíces

Los embriones cultivados en un medio sin sacarosa, con varias concentraciones de manitol, muestran elongación del hipocotilo pero no diferenciación del sistema radical, aún después de 3 meses de cultivo.

Según Street (1962; citado por González-Bernáldez et al. 1968), el crecimiento primario de la raíz se caracteriza por la integración de dos procesos parcialmente independientes, como son: la formación de nuevas células, producto de las divisiones que ocurren en el meristema, y la elongación celular en el transcurso de la diferenciación. La etapa meristemática siempre precede a la elongación. Según lo discutido en el aparte 5.3.3, se puede concluir que el bajo potencial osmótico de los medios con 0 de sacarosa y varias concentraciones de manitol, no fue suficientemente negativo para estimular la elongación y división de las células iniciales de la raíz. Sin embargo, en algunos pocos casos se visualizó la aparición de la radícula, aunque ésta no continuó su desarrollo.

La inhibición de la rizogénesis, en embriones cultivados en ausencia de sacarosa, podría deberse a la falta de carbohidratos disponibles para dicho proceso. Muchos autores han enfatizado la importancia de los carbohidratos exógenos y del nivel interno de los mismos en los tejidos, para el proceso de formación de raíces.

adventicias a partir de esquejes de diferentes especies (trabajos citados por Greenwood y Berlyn 1973 y Hyndman et al. 1982); en diferentes tejidos cultivados in vitro (Spanjersberg y Gautheret 1963); así como en embriones somáticos (Kochba et al. 1974; Lazzeri et al. 1987). Tanto en sistemas in vivo como in vitro, la función de la sacarosa en dicho proceso, parece ser más nutricional que osmótico, ya que su efecto no se ha logrado reproducir con la utilización de manitol (Moore et al. 1972; Greenwood y Berlyn 1973; Hyndman et al. 1982). Además, aunque la formación de raíces muestra respuesta a un aumento en la concentración de sacarosa, también aumenta cuando se diluye el medio basal. Si en el estímulo de la rizogénesis mediara un efecto osmótico, se esperaría una respuesta paralela al aumento de la concentración de sales. Esta respuesta a la dilución del medio se relaciona más con la necesidad de un bajo nivel de nitrógeno (Welandner 1976; Hyndman et al. 1982) que con el potencial osmótico. Sin embargo, en embriones somáticos de *Medicago*, Lazzeri et al. (1987), encontraron que las altas concentraciones de glucosa muestran mayor inhibición que las mismas concentraciones de sacarosa. Los autores, basados en el hecho que una concentración dada de glucosa produce un potencial osmótico más negativo que la misma concentración de sacarosa, atribuyen la inhibición a un efecto osmótico.

La importancia de los carbohidratos para la formación de raíces puede explicarse por los eventos que ocurren a

nivel celular durante dicho proceso ya que, según Thorpe (1980), los cambios estructurales observados durante la organogénesis in vitro, son una manifestación de los procesos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos. Así, por ejemplo, Brossard (1977) encontró que la iniciación de la formación de raíces en discos foliares de Crepis capillaris, se acompaña por un aumento en la concentración de almidón de los explantes, principalmente en las células parenquimáticas que rodean los sitios de iniciación de la raíz. En explantes de Picea, también se detectó la acumulación de almidón en las células próximas a los meristemoides de raíz. Lo mismo ocurre en el enraizamiento in vivo de esquejes de varias especies (Rodríguez et al. 1988). La acumulación de almidón, previa a los procesos morfogenéticos se ha observado en varios sistemas: en la diferenciación de brotes (Brossard-Chriqui e Iskander 1980; Patel y Berlyn 1983; Patel y Thorpe 1984; Douglas 1985; y trabajos en sistemas de callos de tabaco del grupo de Thorpe, citados en Thorpe 1985); así como en la diferenciación de callos embriogénicos (Yeh y Chang 1987). El almidón, en callos organogénicos de tabaco, funciona como reserva energética para un proceso altamente endergónico, como lo es la formación de brotes (Thorpe 1985). Este fenómeno podría asociarse también con la iniciación de los primordios de raíz (Brossard 1977; Patel et al. 1986), y su función podría ser llenar las necesidades nutricionales de los primordios en crecimiento (Rodríguez et al. 1988) y la energía

provendría de las reservas amiláceas. La importancia de la sacarosa para los procesos morfogenéticos quedó clara, cuando Thorpe et al. (1986), demostraron, por primera vez, que el almidón es sintetizado directamente a partir de la sacarosa del medio.

Sin embargo, el almidón también cumple una función osmótica, al constituir una fuente de sustancias osmóticamente activas. Los tejidos organogénicos presentan potenciales osmóticos más negativos en relación a los tejidos en proliferación (Brown y Thorpe 1980; Hammersley-Straw y Thorpe 1988). En condiciones organogénicas la absorción de agua es más importante que la acumulación de materia seca (Vasseur y Roger 1983), posiblemente por la disminución del potencial osmótico de los tejidos.

También cabe la posibilidad que el potencial osmótico del medio influya en el proceso de rizogénesis, por su efecto sobre la diferenciación del xilema. En varios sistemas, se ha demostrado que la formación de raíces adventicias se realiza en la vecindad del tejido vascular, a partir del cual se origina la raíz (Esau 1977; Hartmann y Kester 1983; Brossard 1977). En brotes de Picea, las raíces emergen a partir de las traqueidas que se encuentran en contacto con el sistema vascular del brote (Patel et al. 1986). Algunos estudios realizados sobre el origen de las raíces adventicias y de la rizogénesis normal en plántulas, permiten hacer las siguientes comparaciones. Bender et al.

(1987), compararon el origen de las raíces en plántulas provenientes de brotes y semillas de Thuja. En las primeras, el sistema radical se origina a partir de raíces adventicias y, en las segundas, a partir de la radícula. Sin embargo, en ambas, el tejido vascular del brote está conectado directamente con el de las raíces. En callos de Fraxinus, la disminución del potencial hídrico del medio con polietilenglicol, considerado inerte nutricionalmente, lograron aumentar el efecto de la auxina sobre la diferenciación del xilema (Doley y Leyton 1970). Abou-Mandour y Hartung (1986) encontraron que la reducción del potencial osmótico del medio con manitol, incrementan el número de raíces formadas a partir de callos de maíz. Algunos autores, en trabajos pioneros (citados por Aloni 1980 y Thorpe 1985), atribuyeron a la sacarosa una función morfogénica directa sobre la diferenciación del xilema. Sin embargo, Aloni (1980) no pudo demostrar esta hipótesis. Por ende, la inhibición de la formación de raíces, en el medio sin sacarosa, podría deberse a la falta de un potencial osmótico adecuado que favorezca la xilogénesis; dado que las concentraciones de manitol son demasiado bajas y no causan estrés osmótico. Esta deficiente diferenciación del sistema vascular no permitiría la iniciación de las raíces. Asimismo, la deficiente xilogénesis, obstaculizaría el movimiento basípeto de auxina, el cual se realiza principalmente vía xilema. La acumulación de auxina en la base de los embriones de Pinus cultivados in vitro, precede

a la regeneración de raíces (Greenwood y Goldsmith 1970). En varios estudios se sugiere la existencia de una interacción entre la sacarosa y los reguladores del crecimiento que estimulan la rizogénesis. Butcher y Street (1960), en raíces aisladas de tomate, encontraron que a bajas concentraciones de sacarosa, tanto el ANA como el AG3, estimulan el número de raíces laterales. Sin embargo, a altas concentraciones, tanto el ANA como el AG3 ejercen un efecto inhibitor. La concentración óptima de ANA para la inducción de raíces disminuye conforme aumenta la concentración de sacarosa. De modo similar, en esquejes de Pinus lambertiana, el AIA aumenta el número de raíces en un ámbito amplio de concentraciones de sacarosa (0 a 14%); pero este regulador sólo incrementa el número de raíces a niveles de sacarosa inferiores al óptimo (8%). Altman y Wareing (1975), en esquejes de plantas de Phaseolus, demostraron que el AIA aplicado exógenamente aumenta la cantidad de azúcares acumulados en los sitios de iniciación de raíces. En embriones somáticos de Citrus, la adición de AG3 más sulfato de adenina, mejoró el enraizamiento en un ámbito amplio de concentraciones de sacarosa, y aún a concentraciones en que la sacarosa sola lo inhibió (Kochba et al. 1974). En brotes de Begonia, el mayor número de raíces por brote se produjo con una concentración 0,3 molar de ANA y 0,3% de sacarosa o con 10 mg.l⁻¹ de ANA y 1% de sacarosa (Takayama y Misawa 1981). Estos resultados podrían asociarse con los obtenidos en la presente investigación, en la cual no se utilizaron

reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, lo cual provocaría un mayor requerimiento de sacarosa para la formación de raíces.

La inhibición de la rizogénesis a altas concentraciones de sacarosa, con diferentes concentraciones de manitol, podría relacionarse con un aumento en la concentración de almidón y la ausencia de hidrólisis subsiguiente. Hammersley-Straw y Thorpe (1988) demostraron que a altas concentraciones de sacarosa ocurre un acumulamiento continuo de almidón, lo cual indicaría la ausencia de hidrólisis, que constituye un requisito fundamental, en la etapa final de los otros procesos organogénicos en varios sistemas. La falta de hidrólisis de almidón reduciría la disponibilidad de sustancias osmóticamente activas, que permitan la disminución del potencial osmótico de los tejidos, y por consiguiente la absorción de agua en embriones de café, y consecuentemente la diferenciación de órganos, como las raíces. Este fenómeno también podría ser una posible explicación para el efecto sobre la disminución del crecimiento de los embriones a potenciales osmóticos muy negativos.

5.5 Inhibición de la germinación de embriones

En el presente estudio se consideró como germinado el embrión en el cual se observó la emergencia de la radícula. Tomando este criterio, se puede considerar que ni los

embriones cultivados en medios sin sacarosa ni aquellos cultivados en concentraciones altas (8, 12 y 18%) pudieron germinar. Sin embargo, los embriones cultivados en los medios sin sacarosa presentaron elongación del epicotilo, mientras que esto no ocurrió en aquellos cultivados en los medios con 12 o 18% de sacarosa. En la semilla intacta, la absorción de agua es un hecho que induce la germinación (salida de la radícula). Si se comparan nuestros resultados con los de Dunwell (1981), quien observó que un aumento en la concentración de sacarosa del medio provoca una reducción del contenido de agua de los embriones de cebada, se podría asumir que las altas concentraciones de sacarosa inhiben la germinación de embriones al disminuir la absorción de agua. Este efecto de la sacarosa puede ser un efecto osmótico. Varios autores han señalado la importancia de un bajo potencial osmótico para retrasar la germinación precoz en embriones inmaduros (Rijven 1952; Mauney 1961; Raghavan y Torrey 1963; Finkelstein y Crouch 1985). El fenómeno denominado germinación precoz ocurre cuando los embriones jóvenes se aíslan y cultivan in vitro, y designa un estado en el cual se detiene el crecimiento embrionario y disminuye la síntesis de proteínas características de los embriones maduros, para dar lugar a la aparición de plántulas débiles y malformadas (Norstog 1979; Raghavan 1980). Por ello se ha asumido que algunos factores del ambiente seminal son necesarios para la continuación del crecimiento embrionario y la prevención de la germinación precoz. La necesidad de

un bajo potencial osmótico se relaciona con el hecho que los embriones in ovulo, están rodeados por un fluido de alta osmolaridad (potencial osmótico muy negativo) (Kerr y Anderson 1944; Mauney 1961; Ryckowski 1960a, 1969; Smith 1973; Yeung y Brown 1982). La disminución artificial del potencial osmótico, mediante la utilización de altas concentraciones de sacarosa o con la adición de manitol, permite la continuación del crecimiento embrionario al mismo tiempo que retrasa la germinación precoz. Estos altos valores osmóticos han sido obtenidos con concentraciones de 10% de sacarosa: 10% (Mauney 1961), 18% (Raghavan y Torrey 1963) o concentraciones osmóticamente equivalentes de NaCl o manitol. Finkelstein y Crouch (1986), en embriones jóvenes y próximos a la madurez de Brassica, lograron inhibir la germinación con adiciones de sorbitol a 8,7 y 12,5%, a un medio con 1% de sacarosa. Sin embargo, la germinación de embriones maduros no se inhibió con ninguna concentración de sorbitol. Estos autores señalan que posiblemente el potencial hídrico de los embriones maduros es sumamente negativo, ya que el de la semilla alcanza cerca de -4000 bares, por lo cual el gradiente de potencial creado, entre el medio de cultivo y el explante, no logra equilibrarse, y siempre favorece la imbibición de agua, por lo cual se presenta la germinación. Sin embargo, los resultados de la presente investigación muestran que los embriones cigóticos de café pueden conservarse hasta por 3 meses sin germinar, aún cuando las semillas se sometieron a un período previo de

imbibición, lo cual podría haber desencadenado los procesos metabólicos que inician la germinación.

Sería interesante, para fines de conservación e inhibición de la germinación de embriones maduros de café, medir el potencial osmótico de los embriones o del endosperma y utilizar concentraciones isoosmóticas de manitol u otros reguladores osmóticos, con el fin de impedir la absorción de agua y mantenerlos en estado quiescente por más tiempo.

El efecto del bajo potencial osmótico en la inhibición de la germinación de embriones de Coffea podría deberse a un aumento en la concentración endógena de ABA. Se ha demostrado que la síntesis de este regulador se promueve en diferentes tejidos sujetos a estrés osmótico (Wong y Sussex 1980; Creelman y Zeevart 1987). Este compuesto, cuando se adiciona al medio de cultivo, también inhibe la germinación precoz de embriones jóvenes cultivados in vitro (Norstog 1979; Crouch y Sussex 1981). En particular, en embriones inmaduros de trigo y cebada (Morris et al. 1985) y de Brassica (Finkelstein y Crouch 1985), los efectos del bajo potencial osmótico fueron idénticos a los producidos por la adición de ABA, respecto a la morfología, peso fresco y contenido de proteínas. Sin embargo, Finkelstein y Crouch (1986) demostraron que las cantidades de ABA endógeno de embriones de Brassica cultivados en condiciones de estrés osmótico, inhibitorias de la germinación precoz, es menor que el contenido de ABA de los embriones in situ. Morris et al. (1988) observaron que en embriones de cebada los niveles

endógenos de ABA aumentan considerablemente, con una disminución del potencial osmótico, ello no sucede en embriones de trigo, aunque en ambos se inhibe la germinación precoz. Los dos grupos de investigadores concluyen que el efecto del potencial osmótico y del ABA en la inhibición de la germinación es la reducción de la absorción de agua. Wang et al. (1987), demostraron que en embriones de Pisum, el potencial osmótico del medio puede alterar la absorción de agua, la cual está determinada genéticamente. Morris et al. (1988) considera que cuando los embriones inmaduros se cultivan en condiciones de estrés osmótico, ocurre un "ajuste" interno del nivel de ABA, de manera que la influencia combinada del regulador del crecimiento endógeno y del osmoregulador endógeno inhiban la germinación: cuando los niveles de ABA dentro de los embriones junto con el osmoregulador aplicado no es suficiente para prevenir la germinación, se produce un aumento de ABA. Por tanto, en este estudio, no se descarta que la inhibición de la germinación producida en medios con altas concentraciones de sacarosa y varias concentraciones de manitol, se correlacione con un aumento del ABA de los embriones. Ya en semillas de café, Valio (1976) demostró que el ABA ejerce un efecto inhibitorio sobre la germinación.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente estudio, se llegó a las siguientes conclusiones.

1. Los embriones cigóticos de C. canephora, aislados y cultivados en un medio con BA y ANA, mostró ser un sistema rápido y eficiente de obtención de embriones somáticos. Por lo tanto, se podrían utilizar con el objetivo de obtener gran número de embriones somáticos en poco tiempo para estudios de conservación y de otro tipo. Por ejemplo, para la obtención de embriones somáticos provenientes de semillas poliembriónicas, y con el fin de detectar la presencia de individuos haploides, por medio de estudios del nivel de ploidía.
2. La técnica de microinjerto, utilizando embriones cigóticos como portainjerto, puede utilizarse para el mantenimiento en estado quiescente de embriones cigóticos y somáticos, por lo cual ofrece una alternativa para el intercambio y mantenimiento a mediano plazo de germoplasma de café. Asimismo, ofrece la posibilidad de utilizarlo posteriormente con

microestacas de Coffea, ya que mostró ser factible con éstas últimas. Se podría utilizar posteriormente con embriones cigóticos de semillas poliembriónicas de Coffea, para la obtención de plántulas haploides. Otro aspecto a considerar sería la histología del microinjerto in vitro, y factores que puedan mejorar el éxito de los injertos.

3. Los embriones cigóticos de Coffea pudieron mantenerse sin germinar hasta por 4 meses en medios de cultivo de alto potencial osmótico, restaurándose posteriormente su capacidad de germinación. Este hecho se podría utilizar posteriormente en estudios con embriones somáticos, para permitir el mantenimiento de los mismos por largos periodos. Se recomienda, por tanto estudiar el efecto de concentraciones de sacarosa entre 80 y 120% , así como de concentraciones más altas de manitol (p.ej. 0,5 M), así como de otros osmoreguladores como polietilenglicol y sorbitol. También sería importante el estudio de conservación de embriones cigóticos inmaduros con fines de posterior crioconservación. Se demostró que en ausencia de sacarosa, se presenta un alto porcentaje de muerte de embriones, por lo cual, aunque los embriones que logran sobrevivir, se mantuvieron en estado quiescente y con buen aspecto durante 4 meses, no se recomienda como método de conservación.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABOU HANDOUR, A.A.; HARTUNG, W. 1986. The effect of abscisic acid and increased osmotic potential of the media on growth and root regeneration of Zea mays callus. Journal of Plant Physiology (Alemania) 122(2):139-145.
- ADAMSON, D. 1962. Expansion and division in auxin-treated plant cells. Canadian Journal of Botany (Can.) 40(5):719-744.
- AHLGREN, C.E.; AHLGREN, I.F. 1978. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needle pine species. Forest Science (EE.UU.) 24(1):100-102.
- ALONI, R. 1980. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. Planta (Alemania) 150(3):255-263.
- AL SKIEFF, J. 1977. Sur le greffage in vitro d'apex sur des plantules décapitées, de pêcher (Prunus persica, Batsch.). Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, série D (Francia) 23(4):267-270.
- ; VILLEMUR, P. 1978. Greffage in vitro d'apex sur des plantules décapitées de pommier (Malus pumila Mill.). Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Série D (Francia) 287(12):1115-1118.
- AL THAN, A.; WAREING, P.F. 1975. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labeled assimilates in relation to root formation in Phaseolus vulgaris cuttings. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 33(1):32-38.
- ANNIRATO, P.V.; STEWARD, F.C. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. Botanical Gazette (EE.UU.) 132(2):149-159.
- ARCILA PULGARIN, J. 1987. Aspectos fisiológicos de la producción de café. 2. La semilla del café y proceso germinativo. In Tecnología del cultivo del café. Manizales, Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de café (Cenicafé) p.61-72.

- AUGEREAU, J.M.; COURTOIS, D.; PETIARD, V. 1986. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Reports (Alemania)* 5(5):372-376.
- BACCHI, O. 1955. Seca da semente de café ao sol. *Bragantia (Bra.)* 14(22):225-236.
- , 1956. Novos ensaios sobre a seca da semente de café ao sol. *Bragantia (Bra.)* 15(8):83-91.
- , 1958. Estudos sobre a conservação de sementes. 4. Café. *Bragantia (Bra.)* 17(20):261-270.
- BAJAJ, Y.P.S. 1984. Induction of growth in frozen embryos of coconut and ovules of Citrus. *Current Science (India)* 53(22):1215-1216.
- , 1985. Cryopreservation of embryos. In *Cryopreservation of plant cells and organs*. Ed. by K.K. Kartha. Boca Raton, Fla., CRC. p.227-242.
- BALL, E. 1953. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. *Bulletin of the Torrey Botanical Club (EE.UU.)* 80(5):409-411.
- , 1959. Growth of the embryo Ginkgo biloba under experimental conditions. 3. Growth rates of root and shoot upon media absorbed through the cotyledons. *American Journal of Botany (EE.UU.)* 46(2):130-139.
- BAFAT, V.A.; RAO, P.S. 1984. Regulatory factors for *in vitro* multiplication of sandalwood tree (Santalum album Linn.). 1. Shoot bud regeneration and somatic embryogenesis in hypocotyl cultures. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Plant Science (India)* 93(1):19-27.
- BARG, R.; UNIEL, H. 1977. Effects of sugar concentration on growth, greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania)* 81(2):161-166.
- BARTHE, P.; BLUARD, C. 1982. Influence of agar and sucrose on the behaviour of dormant apple embryos cultured *in vitro*. *The New Phytologist (G.B.)* 91(3):517-529.
- BAUHANN, T.W. 1986. Biotechnology, its potential for the growth and manufacture of coffee. In *Colloque Scientifique International sur le Café (II, 1985, Lomé, Togo)*. Paris, Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). p.55-61.

- BAYSDORFER, C.; VANDERWOUDE, W.J. 1988. Carbohydrate responsive proteins in the roots of Permisetum americanum. Plant Physiology 87(3):566-570.
- BECUAR, M.R.; STANWOOD, P.C.; LEONHARDT, K.W. 1983. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 108(4):613-618.
- BIENDAMA, F.E. 1962a. The physiology of coffee seeds. 1. Problems related to storage. Coffee (Costa Rica) 4(15):73-75.
- 1962b. The physiology of coffee seeds. 2. Factors retarding germination, parchment. Coffee (Costa Rica) 4(15):76-79.
- BERTRAND-DESBRUNAIS, A.; FABRE, J.; ENGELMANN, F.; DEREUDRE, J.; CHARRIER, A. 1988. Reprise de l'embryogénèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier (Coffea arabica L.) après leur congélation dans l'azote liquide. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III (France) 307:795-801.
- BHATT, P.N.; BHATT, D.P.; SUSSEX, I. 1983. Studies on some factors affecting solasodine contents in tissue cultures of Solanum nigrum. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 57(1):159-162.
- BROSSARD, D. 1977. Root organogenesis from foliar discs of Crepis capillaris L. Walbr. cultured in vitro: cytochemical and microspectrophotometric analysis. The New Phytologist (G.R.) 79(2):423-429.
- BROSSARD-CHRIQUI, D.; ISKANDER, S. 1980. Particularités ultrastructurales de l'amyllogénèse provoquée in vitro dans les explants foliaires du Datura innoxia Mill. Journal of Ultrastructure Research (EE.UU.) 18(3):428-443.
- BROWN, D.C.W.; LEUNG, D.W.H.; THORPE, T.A. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 46(1):36-41.
- ; THORPE, T.A. 1980. Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 49(1):83-87.

- BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. 1986. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. 3. Graft formation in embryogenic tissues. *Canadian Journal of Botany (Can.)* 64(9):2057-2062.
- BUFFARD-MOREL, J. 1968. Recherches sur la culture "in vitro" des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Dura*). 5. Effets du glucose, du lévulose, du maltose et du saccharose. *Oléagineux (Francia)* 23(12):707-711.
- BURGHARDOVA, K.; TUPY, J. 1980. Utilization of exogenous sugars by excised maize embryos in culture. *Biologia Plantarum (Checoslovaquia)* 22(1):57-64.
- BUTCHER, D.N.; STREET, H.E. 1960. The effects of gibberellins on the growth of excised tomato roots. *Journal of Experimental Botany (G.B.)* 11(32):206-216.
- CANDE, W.Z.; RAY, P.M. 1976. Nature of cell-to-cell transfer of auxin in polar transport. *Planta (Alemania)* 129(1):43-52.
- CAPLIN, S.M. 1959. Mineral-oil overlay for conservation of plant tissue cultures. *American Journal of Botany (EE.UU.)* 46(5):324-329.
- CAPOT, J. 1972. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire, les hybrides "arabusta". *Café, Cacao, Thé (Francia)* 16(1):3-18.
- CARVALHO, M.M.; ALVARENGA, G. 1979. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do caféiro (*Coffea arabica* L.), para a germinação. In *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras* (7., 1979, Araxá, Bra.). Resumos. Rio de Janeiro, IBC/GERCA. p.118-119.
- CLELAND, R.E. 1977. The control of cell enlargement. In *Integration of activity in the higher plant*. Ed. by D.H. Jennings. Cambridge, Cambridge University Press. p.101-105 (S.E.B Symposium 31).
- CODRON, H.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; FALLLOT, J. 1978. Mise au point d'un nouveau système d'étude de la senescence des cellules végétales. *Comptes Rendus Hebdomadaires de l'Académie des Sciences, Série D (Francia)* 287(1):21-24.
- ; LATCHE, A.; PECH, J.C.; NEBIE, B.; FALLLOT, J. 1979. Control of quiescence and viability in auxin-deprived pear cells in batch and continuous culture. *Plant Science Letters (Holanda)* 17(1):29-35.

- COLONNA, J.P.; CAS, G.; RABECHAU, H. 1971. Mise au point d'une méthode de culture in vitro d'embryons de caféiers. Applications a deux variétés de caféiers cultivés. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Série D (France) 272(1):60-63.
- 1972. Contribution à l'étude de la culture in vitro d'embryons de caféiers. Action de la caféine. Café, Cacao, Thé (France) 16(3):193-202.
- COSTE, R. 1955. Les caféiers et les cafés dans le monde. Tome 1. Les caféiers. Paris, Larose. 381p.
- COUTURON, E.; BERTHAUD, J. 1979. Le greffage d'embryons de caféiers. Mise au point technique. Café, Cacao, Thé (France) 23(4):267-270.
- 1980. Le maintien de la viabilité des graines de caféiers par leur contrôle de leur teneur en eau et de la température de stockage. Café, Cacao, Thé (France) 24(1):27-32.
- 1982. Obtention d'haploïdes spontanés de Coffea canephora Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. Café, Cacao, Thé (France) 26(3):155-160.
- CRAM, W.J. 1984. Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 61(3):396-404.
- CREELMAN, R.A.; ZEEVART, J.A.D. 1985. Abscisic acid accumulation in spinach leaf slices in the presence of penetrating and nonpenetrating solutes. Plant Physiology (EE.UU.) 77(1):25-28.
- CRESS, W.A.; JOHNSON, G.V. 1987. The effect of three osmotic agents on free proline and amino acid pools in Atriplex canescens and Hilaria jamesii. Canadian Journal of Botany (Can.) 65(4):799-801.
- CROUCH, H.L.; SUSSEX, I.N. 1981. Development and storage protein synthesis in Brassica napus L. embryos in vivo and in vitro. Planta (Alemania) 153(1):64-74.
- CHANDLER, S.F.; THORPE, T.A. 1987. Characterization of growth, water relations, and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of Brassica napus L. cv Westar (Canola). Plant Physiology (EE.UU.) 84(1):106-111.

- ; RAGOLSKI, E.; PUA, E.-C.; THORPE, T.A. 1987. Some morphogenetic effects of sodium sulfate on tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 11(2):141-150.
- CHANDLER, T.M.; DE MARSAC, N.T.; DE KOUCHKOVSKY, Y. 1972. Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Canadian Journal of Botany* (Can.) 50(11):2265-2270.
- CHARRIER, A. 1986. Progrès et perspectives de l'amélioration génétique des caféiers. *In* Colloque Scientifique International sur le Café. (11., 1985, Lomé, Togo). Paris, Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). p.403-425.
- CHEN, Y.; ZAHARI, E.; BARAK, P.; UMIEL, N. 1980. Effects of salinity stresses on tobacco. 1. The growth of Nicotiana tabacum callus cultures under seawater, NaCl and mannitol stresses. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* (Alemania) 98(2):141-153.
- CHIN, H.F. 1978. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics. *Acta Horticulturae* (Holanda) 83:17-21.
- CHINNAPPA, C.C. 1968. Interspecific hybrids of Coffea canephora and C. arabica. *Current Science* (India) 37(23):676-677.
- DANQUECHIN-DORVAL. 1983. Thèse D.E.A. Montpellier, Francia.
- DEDECCA, D.M. 1958. Recent advances in our knowledge of coffee tree. 4. Anatomy. *Coffee and Tea Industries and the Flavor Field* (EE.UU.) 81(11):46-50.
- DEREUDRE, J.; FABRE, J.; BASSAGLIA, C. 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (Dianthus caryophyllus L. var Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. *Plant Cell Reports* (Alemania) 7(3):170-173.
- DOERPINGHAUS, S.L. 1947. Differences between species of Datura in utilization of five carbohydrates. *American Journal of Botany* (EE.UU.) 34(10):583.
- DOLEY, D.; LEYTON, L. 1970. Effects of growth regulating substances and water potential on the development of wound callus in Fraxinus. *The New Phytologist* (G.B.) 69(1):57-102.

- DOUDOROFF, M.; KAPLAN, N.; HASSID, W.J. 1943. Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation. *The Journal of Biological Chemistry* (EE.UU.) 48(1):67-75.
- DOUBLAS, G.C. 1985. Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus hybrid TT 32* cultured in vitro: effects of sucrose, zeatin, IAA and ABA. *Journal of Plant Physiology* (Alemania) 121(3):225-231.
- DUBLIN, P.; PARVAIS, J.P. 1975a. Note sur les premiers haploïdes spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. Robusta. *Café, Cacao, Thé* (Francia) 19(3):191-196.
- ; PARVAIS, J.P. 1975b. Sur la recherche des haploïdes issus de polyembryons chez le *C. arabica*. In Colloque International sur la chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés. (7., 1975, Hamburgo, Alemania). (Rapport). Paris, Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). p.505-511.
- , 1984. Techniques de reproduction *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café, Cacao, Thé* (Francia) 28(4):231-244.
- DUFFUS, C.M.; ROSIE, R. 1975. Biochemical changes during embryogeny in *Hordeum distichum*. *Phytochemistry* (G.B.) 14(2):319-323.
- DUNCAN, D.R.; WIDHORN, J.H. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiology* (EE.UU.) 83(3):703-708.
- DUNWELL, J.M. 1981. Influence of genotype and environment on growth of barley embryos *in vitro*. *Annals of Botany* (G.B.) 48(4):535-542.
- , 1985. Haploid cell cultures. *In* Plant cell culture; a practical approach. Ed. by R.A. Dixon. Oxford, IRI Press. p.21-36. (Practical approach series).
- ; THURLING, N. 1985. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Journal of Experimental Botany* (G.B.) 36(170):1478-1491.
- DURANTON, H.; SCHANTZ, R.; KIENZ, J.-G. 1964. Influence des glucides sur la synthèse de la chlorophylle chez les explants calibrés de topinambour cultivés *in vitro*. *Bulletin de la Société Française de Physiologie Végétale* (Francia) 110:186-194.

- EDELMAN, J.; HANSON, A.D. 1972. Sucrose-suppression of chlorophyll synthesis in carrot tissue cultures. *Journal of Experimental Botany* (G.B.) 23(75):469-478.
- ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. v.2. Compendium of specific germination information and tests recommendations. Rome, International Board for Plant Genetic Resources. 667 p. (Handbook for genebanks no.3; AGP/IBPGR 85/85).
- ENGELMANN, F.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. 1985. Survie et prolifération d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) après congélation dans l'azote liquide. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III* (Francia) 301(3):111-116.
- ; BAUBAULT, C. 1986. La cryoconservation des embryons somatiques, polliniques et zygotiques. *Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques* (Francia) 133(3):89-103.
- ; DUVAL, Y. 1986. Cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.): résultats et perspectives d'application. *Oléagineux* (Francia) 41(4):169-174.
- ; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. 1987. Use of cryoconservation for setting up a bank of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *International Oil Palm/Palm Oil Conferences. Program and Prospects*. Kuala Lumpur, Malaysia. 13p.
- ; DEREUDDRE, J. 1988a. Cryoconservation of oil palm somatic embryos: importance of the freezing process. *Cryo-Letters* (G.B.) 9:220-235.
- ; DEREUDDRE, J. 1988b. Effets du milieu sur la production d'embryoides destinés à la cryoconservation chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III* (Francia) 306:515-520.
- ERNST, R.; ARDITTI, J.; HEALEY, P.L. 1971. Carbohydrate physiology of orchid seedlings. 2. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany* (E.U.S.A.) 58(9):827-837.
- ESAU, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2nd. edition. New York, Wiley. 550p.

- FABRE, J. 1986. Effets du pretraitement sur la résistance à la congélation dans l'azote liquide (-196°C) des méristèmes terminaux et axillaires d'oeillets (Dianthus caryophyllus L., var. Eolo) cultivés in vitro. Mémoire D.E.A. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. Paris. 92 p.
- FINNELSTEIN, R.R.; CROUCH, M.L. 1986. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. *Plant Physiology* (EE.UU.) 81(3):907-912.
- ; CROUCH, M.L. 1987. Hormonal and osmotic effects on developmental potential of maturing rapeseed. *HortScience* (EE.UU.) 20(5):797-800.
- FRANCIET, A. 1979. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. Association Forêt-Cellulose (AFOCEL). Etudes et Recherches (Francia) 12(6):3-18.
- FRANCO, C.M. 1946. Influência do pergaminho sobre a germinação de café. Relatório da Seção de Fisiologia. Campinas, Instituto Agronômico de São Paulo. 7p.
- GAUTHERET, R.J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* (EE.UU.) 6:433-484.
- GENKEL, P.A.; CHAO, T.-S. 1958. The role of plasmodesma in the loss of germinating power in coffee (Coffea robusta) seeds. *Fiziologiya Rastanii Soviet Plant Physiology* (Russia) 5(4):305-309.
- GONZALEZ-BERNALDEZ, F.; LOPEZ-SAEZ, J.F.; GARCIA-FERRERO, G. 1969. Effect of osmotic pressure on root growth, cell cycle and cell elongation. *Protoplasma* (Austria) 65(3):255-262.
- GOPAL, N.H.; RAMAIAH, P.K. 1972. Studies on the physiology of germination of coffee seed. 1. Observations on sprouting. *Journal of Coffee Research* (India) 2(1):14-19.
- GRANATEK, C.H.; COCKERILL, A.N. 1978. Callus formation vs differentiation of cultured barley embryos: hormonal and osmotic interactions. *In Vitro* 14(2):212-217.
- GRAY, D.J. 1987. Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. *HortScience* (EE.UU.) 20(5):810-814.

- GREENWOOD, M.S.; GOLDSMITH, M.H.M. 1970. Polar transport and accumulation of indole-3-acetic acid during root regeneration in Pinus lambertiana embryos. Planta (Alemania) 95(4):297-313.
- ; BERLYN, G.P. 1973. Sucrose-indole-3-acetic acid interactions on root regeneration by Pinus lambertiana embryo cuttings. American Journal of Botany (EE.UU.) 60(1):42-47.
- GROUT, B.W.W.; SHELTON, K.; PRITCHARD, H.W. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. Annals of Botany (G.B.) 52(3):381-384.
- . 1986. Embryo culture and conservation of genetic resources of a species with recalcitrant seeds. In Plant Tissue Culture and its agricultural applications. Ed. by L.A. Withers; P.J. Alderson. London, Butterworths. p.303-309.
- GUPTA, P.K.; DURZAN, D.J.; FINKLE, B.J. 1987. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of Picea abies (Norway spruce) and Pinus taeda (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. Canadian Journal of Forestry (Can.) 17(9):1130-1134.
- HAMMERSLEY-STRAW, D.R.H.; THORPE, T.A.A. 1988. Use of osmotic inhibition in studies of shoot formation in tobacco callus cultures. Botanical Gazette (EE.UU.) 149(3):303-310.
- HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E. 1983. Plant propagation, principles and practices. 4th. edition. New Jersey, Englewood Cliffs. 727 p.
- HEBERLE-BORS, E. 1985. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. Theoretical and Applied Genetics (Alemania) 71(3):361-374.
- HFLGESON, J.P.; UPPER, C.D.; HABERLACH, G.T. 1972. Medium and tissue sugar concentrations during controlled growth of tobacco callus tissues. In Plant Growth Substances 1970. International Conference on Plant Growth Substances (7., 1970, Canberra, Australia). Proceedings. Ed. by D.J. Carr. Berlin, Springer. p.484-492.
- HFLLERGREN, J.; LI, P.H. 1981. Survival of Solanum tuberosum suspension cultures to -14C: the mode of action of proline. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 52(4):449-453.

- HILDEBRANDT, A.C.; RIKER, A.J. 1949. The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, Paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue in vitro. American Journal of Botany (EE.UU.) 36(1):74-85.
- HIXLEY, P.A. 1964a. Some factors which can regulate viability of coffee seeds. Proceedings of the International Seed Testing Association (ISTA) (Holanda) 29(1):33-60.
- 1964b. Investigations on the maintenance of viability of Robusta coffee seed in storage. Proceedings of the International Seed Testing Association (ISTA) (Holanda) 29:423-444.
- HYNDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. 1982. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 1(4):229-238.
- IIHANURA, J.; HARADA, H. 1980. Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 100(4):285-289.
- IIHASEKI, H.; WATANABE, A. 1978. Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. Plant and Cell Physiology (Japón) 19(2):345-348.
- IIIOHUE, M.; YAHAMOTO, R.; MASUDA, Y. 1987. UDP-glucose level as a limiting factor for IAA-induced cell elongation in Avena coleoptile segments. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 69(1):49-54.
- JEFFREE, C.E.; YEOMAN, M.M. 1983. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. New Phytologist (G.B.) 93(4):491-509.
- JGNARD, R.; HUGARD, J.; MACHEIX, J.-J.; MARTINEZ, J.; MOSELIA-CHANCEL, I.; POESSEL, J.L.; VILLENUR, P. 1983. In vitro micrografting and its application to fruit science. Scientia Horticulturae (Holanda) 20(2):147-159.
- JONES, I.H. 1974. Long term survival of embryoids of carrot (Daucus carota L.). Plant Science Letters (Holanda) 2(4):221-224.

- JOURNET, E.P.; BLIGNY, R.; DOUCE, R. 1986. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry* (EE.UU) 261(7):3193-3199.
- KANTHARAT, G.R.; MAHADEVAN, S.; PADMANABAN, G. 1979. Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* (G.B.) 18(3):383-387.
- KARTHA, K.K.; MROGINSKI, L.A.; PAH, K.; LEUNG, N.L. 1981. Germplasm-preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by in vitro culture of shoot apical meristems. *Plant Science Letters* (Holanda) 22(4):301-307.
- KAUL, K.; SABHARWAL, P.S. 1971. Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* (EE.UU.) 47(5):691-695.
- KELLER, W.A.; RAGHATHY, T.; LACAPRA, J. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* (Can.) 17(4):655-666.
- ; ARMSTRONG, K.C. 1978. High frequency production of microspore derived plants from *Brassica napus* anther culture. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 80(2):100-108.
- KERR, T.; ANDERSON, D.E. 1944. Osmotic quantities in growing cotton bolls. *Plant Physiology* 19(2):338-349.
- KETELLAPER, H.J. 1953. The mechanism of the action of indoleacetic acid on the water absorption by *Avena* coleoptile sections. *Acta Botanica Neerlandica* (Holanda) 2:387-444.
- KIMBALL, S.I.; BEVERSDORF, W.A.; BIGHAM, E.T. 1975. Influence of osmotic potential on the growth and development of soybean tissue culture. *Crop Science* (EE.UU.) 15(6):750-753.
- KING, H.W.; ROBERTS, E.H. 1979. The storage of recalcitrant seeds; achievements and possible approaches. Rome, International Board for Plant Genetic Resources. IBPGR Publication AGP:IBPGR 79/44.
- ; ROBERTS, E.H. 1980a. The desiccation response of seeds of *Citrus limon* L. *Annals of Botany* (G.B.) 45(4):489-492.

- ; ROBERTS, E.H. 1980b. Maintenance of recalcitrant seeds in storage. In Recalcitrant crop seeds. Ed. by H. F. Chin; E.H. Roberts. Malaysia, Tropical Press SDN. p. 53-69.
- ; ROBERTS, E.H. 1980c. A strategy for future research into the storage of recalcitrant seeds. In Recalcitrant crop seeds. Ed. by H.F. Chin; E. H. Roberts. Malaysia, Tropical Press SDN. p.90-110.
- KIRKHAM, M.B.; GARDNER, W.R.; GERLOFF, G.C. 1972. Regulation of cell division and cell enlargement by turgor pressure. Plant Physiology (EE.UU.) 49(6):961-962.
- KISHOR, P.B.K.; REDDY, G.M. 1986a. Regeneration of plants from long-term cultures of Oryza sativa L. Plant Cell Reports (Alemania) 5(5):391-393.
- ; REDDY, G.M. 1986b. Retention and survival of regenerating ability by osmotic adjustment in long-term cultures of four varieties of rice. Journal of Plant Physiology (Alemania) 126(1):49-54.
- KITTO, S.L.; JANICK, J. 1985a. A citrus embryo assay to screen water-soluble resins as synthetic seed coats. HortScience (EE.UU.) 20(1):98-100.
- ; JANICK, J. 1985b. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 110(2):277-282.
- ; JANICK, J. 1985c. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 110(2):283-285.
- KOCHBA, I.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. 1974. Stimulation of rooting of Citrus embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. Annals of Botany 38(157):795-802.
- ; BUTTON, J. 1974. The stimulation of embryogenesis in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (Citrus sinensis) as affected by tissue age and sucrose concentration. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 73(5):415-421.
- KOLLMANN, R.; YANG, S.; GLOCKMANN, C. 1985. Studies on graft union. 2. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interface. Protoplasma (Austria) 126(1):19-29.

- KUMAR, A.S.; GAMBORG, O.L.; NABORS, M.W. 1988. Plant regeneration from cell suspension cultures of Vigna acanitifolia. Plant Cell Reports (Alemania) 7(2):138-141.
- KYLE, N.E.; JAKOBEX, J.L.; BACKHAUS, R.A.; STUTZ, J.C.; RIGHETTI, T.L. 1986. Micrografting between N-fixing and non-N fixing genera of the Rosaceae. Botanical Gazette (EE.UU.) 147(3):243-246.
- LAKSHMANA RAO, P.V.; DE, D.N. 1987. Haploid plants from in vitro anther culture of the leguminous tree, Peltoporum pterocarpum (DC) K. Hayne (Copperpod). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 11(3):167-177.
- LEDET, C. 1973. Accroissement de la résistance au gel des tissus de topinambour maintenus en survie. Comptes Rendus Hebdomadaires de l'Académie des Sciences, Série D (Francia) 277(20):2161-2164.
- , 1974. Action de certains oses et polyols sur la résistance au gel des tissus de topinambour maintenus en survie. Comptes Rendus Hebdomadaires de l'Académie des Sciences, Série D (Francia) 278(17):2131-2134.
- LEON, J.; WITHERS, J.A. 1986. Introduction. In Practical guidelines for seed exchange and plant introduction in tropical crops. Ed. by J. León y J.A. Withers. Rome, FAO. p.1-6 (FAO Plant Production and Protection Paper 76).
- LICHTER, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of Brassica napus. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 105(5):427-434.
- LITZ, R.E. 1987. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in Carica suspension cultures. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 111(6):969-972.
- LIU, C.; VASIL, V.; VASIL, I.K. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (Zea mays L.). Theoretical and Applied Genetics (Alemania) 66(3-4):285-289.
- LIU, C.-Y.; THORPE, T.A. 1987. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of Picea glauca. Journal of Plant Physiology (Alemania) 128(3):297-302.

- MAESTRI, M.; VIEIRA, C. 1961. Nota sobre reduçao da porcentagem de germinaçao de sementes de café (Coffea arabica L. var. Bourbon), por efeito do ácido giberélico. *Revista Ceres (Bra.)* 11(65):247-249.
- MARETZKI, A.; THOM, M.; NICKELL, L.G. 1972. Influence of osmotic potentials on the growth and chemical composition of sugarcane cell culture. *Hawaiian Sugar Planters' Record (EE.UU.)* 58(15):183-199.
- MARRE, E.; LADO, P.; RASI CALDOGNO, F.; COLOMBO, R. 1973. Correlation between cell enlargement in pea internode segments and decrease in the pH of the medium of incubation. 1. Effects of fusicorcin, natural and synthetic auxins and mannitol. *Plant Science Letters (Holanda)* 1(5):179-184.
- MASUDA, Y.; SAKURAI, N.; TAZAWA, M.; SHIMMEN, T. 1978. Effect of osmotic shock on auxin-induced cell extension, cell wall changes and acidification in Avena coleoptile segments. *Plant and Cell Physiology (Japan)* 19(5):857-867.
- MAUNEY, J.R. 1961. The culture in vitro of immature cotton embryos. *Botanical Gazette (EE.UU.)* 122(3):205-209.
- MEIJER, E.G.H.; BROWN, D.C.W. 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in Medicago sativa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 10(1):11-19.
- MELLO AYRES, B.C.DE. 1954. A ocorrência de plasmodesmas no endosperma de Coffea arabica L. var. Typica Cramer. *Bragantia (Bra.)* 13(23):281-286.
- MEYER, H.K.C.; LAI, H. 1972. Influence of sucrose of differentiation of cells with zygote like potentialities. *Naturwissenschaften (Alemania)* 59(2):514.
- MICHEL, B.E. 1958. Different species, sucrose, and light in plant section elongation tests. *American Journal of Botany (EE.UU.)* 55(9):1126-1131.

- MONACO, L.C.; CARVALHO, A. 1971. Transfert de résistance à la rouille orangée entre le Coffea canephora et le Coffea arabica. Ciencia e Cultura (Bra.) 23(Suppl.6):101-102.
- ; SÖNDAHL, H.R.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. 1977. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Ed. by J. Reinert; Y.P.S. Bajaj. Berlin, Springer. p.109-129.
- MONNIER, M.; LEDDET, C. 1978. Sur l'acquisition de la résistance au froid des embryons immatures de Capsella bursa-pastoris. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, série D (France) 287(6):615-622.
- . 1980. Contribution de la culture de l'embryon zygotique à la connaissance du développement et de la physiologie de l'embryon in situ. Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques (France) 127(3-4):59-70.
- ; LEDDET, C. 1980. Action du saccharose sur la résistance au gel des embryons immatures de Capsella. Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques (France) 127(3-4):71-77.
- MONTEUUIS, O. 1986. Microgreffage de points végétatifs de Sequoiadendron giganteum séculaires sur de jeunes semis cultivés in vitro. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, série III (France) 302(6):223-225.
- MOORE, K.G.; CORR, A.; LOVELL, P.H. 1972. Effects of sucrose on rooting and senescence in detached Raphanus sativus L. cotyledons. Journal of Experimental Botany (G.B.) 23(74):65-74.
- MOORE, R. 1984. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. American Journal of Botany (E.F.U.U.) 71(5):752-758.
- MORRIS, P.C.; MADDOCK, S.E.; JONES, M.G.K.; BOWLES, D.J. 1985. Changes in the levels of wheat and barley-gem agglutinin during embryogenesis in vivo, in vitro and during germination. Planta (Alemania) 166(3):407-413.
- ; WEILER, E.W.; MADDOCK, S.E.; JONES, M.G.K.; LENTON, J.R.; BOWLES, D.J. 1988. Determination of endogenous abscisic acid levels in immature cereal embryos during in vitro culture. Planta (Alemania) 173(1):110-116.

- MUMFORD, P.M.; GROUT, B.W.W. 1979. Desiccation and low temperature (-196C) tolerance of Citrus limon seed. Seed Science and Technology (Holanda) 7(3):407-410.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 15(3):473-497.
- ; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLIDAY, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilisation towards recovering virus-free Citrus clones. HortScience (EE.UU.) 7(2):118-119.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free Citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science 100(5):471-479.
- NEUMANN, K.-H.; GARCIA, H. DE. 1974. Über den Einfluß der Saccharosenkonzentration auf die Entwicklung von Embryonen aus Zellsuspensionen von Daucus carota L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 74(1):85-90.
- NITZSCHE, W. 1978. Erhaltung der Lebensfähigkeit in getrocknetem Kallus. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 87(5):469-472.
- , 1980. One year storage of dried carrot callus. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 100(3):269-271.
- , 1983. Germplasm preservation. In Handbook of plant cell culture. v.1. Techniques for propagation and breeding. Ed. by D.A. Evans; W. R. Sharp; P.V. Ammirato; Y. Yamada. New York, McMillan. p.782-815.
- NEANG, A.; CHANDIER, G. 1986. Changes during embryogenesis in rainforest seeds with orthodox and recalcitrant viability characteristics. Journal of Plant Physiology (Alemania) 126 (2-3):243-246.
- NORSTOG, R. 1979. Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology. In Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications. Ed. by W.R. Sharp; P.O. Larsen; E.F. Paddock; V. Raghavan. Columbus, Ohio State University Press. p.179-202.
- OTEDA ENCISO, L.A. 1986. Microinjerto in vitro en Cedrela odorata L. empleando ápices juveniles y adultos. Tesis de Maestría. Chapingo, México, Colegio de Postgraduados. 65p.

- OLIVEIRA, J.C. de; SILVA, D.M.da; AMORIM, H.V. de. 1976. Atividade enzimática da polifenol-oxidase e catalase de sementes e plantulas de Coffea arabica L. Científica (Bra.) 4(1):68-71.
- ONO, H.; LARTER, E.N. 1976. Anther culture of Triticale. Crop Science (EE.UU.) 16(1):120-122.
- PAGACZ, E.A. 1960. Contribution à l'étude du mode de semis en caféiculture. Bulletin d'Information de l'INEAC (Belgica) 9(1):1-6.
- PALIYATH, G.; LYNCH, D.V.; THOMPSON, J.E. 1987. Regulation of membrane phospholipid catabolism in senescing carnation flowers. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 71(4):503-511.
- PATEL, K.R.; BERLYN, G.P. 1983. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of Pinus coulteri. Canadian Journal of Botany (Can.) 61(2):575-585.
- ; THORPE, T.A. 1984. Histochemical examination of shoot initiation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Botanical Gazette (EE.UU.) 145(3):312-322.
- ; RUIHARY, C.; THORPE, T.A. 1986a. Plantlet formation in black and white spruce. 3. Histological analysis of in vitro shoot formation and the root-shoot union. New Zealand Journal of Forestry Science (Nueva Zelandia) 16(3):289-296.
- ; KIN, H-R.; THORPE, T.A. 1986. Plantlet formation in pitch pine (Pinus rigida Mill.) by tissue culture methods. Forest Ecology and Management (Holanda) 15(2):147-160.
- PEECH, J.-C.; ROMANI, R.J. 1979. Senescence of pear fruit cells cultured in a continuously renewed, auxin-deprived medium. Plant Physiology (EE.UU.) 64(5):814-817.
- PENDE, V.C.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. 1981. Sucrose mediated regulation of fatty acid composition in asexual embryos of Theobroma cacao. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 53(3):378-384.
- POWELL, W.; UHRIG, H. 1987. Anther culture of Solanum genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 11(1):13-24.

- PRETOVA, A. 1974. The influence of the osmotic potential on the cultivation medium on the development of excised flax embryos. *Biologia Plantarum* (Czechoslovakia) 16(1):14-20.
- FRITCHARD, H.W.; GROUT, B.W.W.; SHORT, K.C. 1986a. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 1. Growth and ultrastructure of sycamore and soybean cell suspensions. *Annals of Botany* (G.B.) 57(1):41-48.
- ; GROUT, B.W.W.; SHORT, K.C. 1986b. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 2. Water relations and metabolic state of sycamore and soybean cell suspensions. *Annals of Botany* (G.B.) 57(3):371-378.
- ; GROUT, B.W.W.; SHORT, K.C. 1986c. Osmotic stress as a pregrowth procedure for cryopreservation. 3. Cryobiology of sycamore and soybean cell suspensions. *Annals of Botany* (G.B.) 57(3):379-387.
- ; PRENDERGAST, F.G. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the in vitro viability of embryos of the recalcitrant seed species Araucaria hunsteinii K. Schum. *Journal of Experimental Botany* (G.B.) 37(192):1388-1397.
- RABECHAUT, H.; CAS, G. 1973. Relations entre l'inhibition par la caféine de la croissance des embryons de Caféiers et leur teneur en phénols totaux. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie de Sciences, Série D (France)* 277(24):2697-2700.
- ; BUFFARD-MOREL, J.; VARECHON, C. 1974. Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.). 11. Effets de la pression osmotique sur la croissance et le développement et sur l'absorption des sucres. *Oléagineux* (France) 29(7):351-356.
- RAGHAVAN, V.; TORREY, J.G. 1963. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of Capsella in culture. *American Journal of Botany* (E.U.) 50(6):540-551.
- 1980. Embryo culture. In Perspectives in plant cell and tissue culture. Ed. by I.K. Vasil. New York, Academic Press. p.209-240. (*International Review of Cytology, Supplement 11B*).
- RAHAGOPAI, S. 1986. Protein synthesis in a maize callus exposed to NaCl and mannitol. *Plant Cell Reports* (Alemania) 5(6):430-434.

- REBEILLE, F.; BLIGNY, R.; MARTIN, J.-B.; DOUCE, R. 1985. Effect of sucrose starvation on sycamore (Acer pseudoplatanus) cell carbohydrate and P_i status. *The Biochemical Journal (O.B.)* 226(3):679-684.
- REDENBAUGH, K.; SLADE, D.; VISS, P.; FUJII, J.A. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* 22(5):803-809.
- RIETSEMA, J.; SATINA, S.; BLAKESLEE, A.F. 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos in vitro. *American Journal of Botany (EE.UU.)* 40(7):534-545.
- RIJVEN, A.H.G.C. 1952. In vitro studies of the embryo of Capsella bursa-pastoris. *Acta Botanica Neerlandica (Holanda)* 1(2):158-200.
- RIOV, J.; YANG, S.F. 1982. Stimulation of ethylene production in citrus leaf discs by mannitol. *Plant Physiology (EE.UU.)* 70(1):142-146.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology (Holanda)* 1(3):499-514.
- , 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. In *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Ed. by D.H. Frankel; J.G. Hawkes. Cambridge, Cambridge University Press. p.269-296.
- ; KING, M.W. 1980. The characteristics of recalcitrant seeds. In *Recalcitrant crop seeds*. Ed. by H.F. Chin; E.H. Roberts. Malaysia, Tropical Press SDN. p.15.
- ; KING, M.W. 1982. Storage of recalcitrant seeds. In *Crop genetic resources; the conservation of difficult material*. Ed. by I.A. Withers; J.T. Williams. Rome, International Union of Biological Sciences/IBPGR. p.39-48.
- , 1984. Monitoring seed viability in genebanks. In *Seed management techniques for genebanks*. Ed. by J.B. Dickie; S. Livingston; J.T. Williams. Rome, International Board for Plant Genetic Resources. p.268-287.
- ; KING, M.W.; ELLIS, R.H. 1984. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In *Crop genetic resources: conservation and evaluation*. Ed. by J.H.W. Holden; J.T. Williams. London, Allen and Unwin. p.38-52.

- ROBY, C.; MARTIN, J.-B.; BLIGNY, R.; DOUCE, R. 1987. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry (EE.UU.)* 262(11):5000-5007.
- ROCA, W.M.; RODRIGUEZ, J.; BELTRAN, J.; ROA, J.; MAFLA, G. 1982. Tissue culture for the conservation and international exchange of germplasm. In *Plant tissue culture 1982. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. [5., 1982, Tokyo]. Proceedings. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture. p. 771-772.
- RODRIGUEZ, A.; ALBUERNE, M.; SANCHEZ TAMES, R. 1988. Rooting ability of Corylus avellana L.: macromorphological and histological study. *Scientia Horticulturae (Holanda)* 35(1-2):131-142.
- RUBINSTEIN, B.; MAHAR, P.; TATTAR, T.A. 1977. Effects of osmotic shock on some membrane-regulated events of oat coleoptile cells. *Plant Physiology (EE.UU.)* 59(3):365-368.
- 1977. Osmotic shock inhibits auxin-stimulated acidification and growth. *Plant Physiology (EE.UU.)* 59(3):369-371.
- RUBLUO, A.; KARTHA, K.K. 1985. In vitro culture of shoot apical meristems of various Phaseolus species and cultivars. *Journal of Plant Physiology (Alemania)* 119(5):425-433.
- RUESINK, A.W. 1978. Leucine uptake and incorporation by Convolvulus tissue culture cells and protoplasts under severe osmotic stress. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 44(1):48-56.
- RYCZKOWSKI, M. 1960a. Changes of the osmotic value during the development of the ovule. *Planta (Alemania)* 55(4):343-356.
- 1960b. Changes of the viscosity of the central vacuolar sap during the development of the ovule. *Planta (Alemania)* 55(4):357-364.
- 1969. Changes in osmotic value of the central vacuole and endosperm sap during growth of the embryo and ovule. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania)* 61(5):422-429.

- , 1978. Respiration rate (Q_{O_2}) gradient in the endosperm and embryo during the exponential phase of its growth. *Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques (Francia)* 125(1-2):285-288.
- , 1980. Physico-biochemical and physiological gradients in the ovule during embryogenesis. *Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques (Francia)* 127(3-4):51-58.
- SACHER, J.A. 1973. Senescence and postharvest physiology. *Annual Review of Plant Physiology (EE.UU.)* 24:197-224.
- SAKAI, A.; YOSHIDA, S. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology (EE.UU.)* 5:160-174.
- SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. 1987. Effects of sucrose on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 71(4):455-458.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.R. 1969. *Plant Physiology*. Belmont, California, Wadsworth. p.66-67.
- SCHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany (Can.)* 50(1):199-204.
- SCHILDE-RENTSCHLER, L. 1979. *In vitro* maintenance of valuable *Solanum* resources at CIP. In *Planning Conference on the Exploration, Taxonomy and maintenance of potato germ plasm III*. [1979, Lima, Perú]. Report. Ed. by International Potato Center. Lima, CIP. p.182-189.
- ; ESPINOZA, N.; ESTRADA, R.; LIZARRAGA, R. 1982. *In vitro* storage and distribution of potato germplasm. In *Plant Tissue Culture 1982*. International Congress of Plant Tissue Culture. [5., Tokyo, 1982]. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture. p.781-782.
- SHARP, W.R.; DOUGALL, D.K.; FADDOCK, E.F. 1971. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club (EE.UU.)* 98(4):218-230.
- SHELDRAKE, A.R. 1979. Effects of osmotic stress on polar auxin transport in *Avena* mesocotyl sections. *Planta (Alemania)* 145(2):113-117.

- SINGHA, S.; OGBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. 1987. Changes in nutrient composition and pH of the culturing during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 11(3):209-220.
- SMITH, J.G. 1973. Embryo development in Phaseolus vulgaris. 2. Analysis of selected inorganic ions, ammonia, organic acids, amino acids, and sugars in the endosperm liquid. *Plant Physiology (EE.UU.)* 51(3):454-458.
- SÄNDHILL, M.R.; SHARP, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of C. arabica L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania)* 81(5):395-408.
- ; NAKAMURA, T.; MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C.; COSTA, W.M. 1984. Coffee. In *Handbook of Plant Cell Culture. v.3. Crop Species*. Ed. by P.V. Ammirato; D.A. Evans; W.R. Sharp; Y. Yamada. New York, MacMillan. p.564-590.
- SOPORY, D.K. 1979. Effect of sucrose, hormones and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid Solanum tuberosum. *Canadian Journal of Botany (Can.)* 57(23):2691-2694.
- SPANJERSBERG, ; GAUTHERET, R.J. 1963. Sur les facteurs de la néoformation des racines par les tissus de topinambour cultivés *in vitro*. *Bulletin de la Société Botanique de France, Mémoires (Francia)* 110:47-66.
- STAFFORD, A.; DAVIES, D.R. 1979. The culture of immature pea embryos. *Annals of Botany (G.B.)* 44(3):315-321.
- STARITZKY, G.; DEKKERS, A.J.; LOUWAARS, N.P.; ZANDVOORT, E.A. 1986. *In vitro* conservation of aroid germplasm at reduced temperatures and under osmotic stress. In *Plant tissue Culture and its Agricultural Applications*. Ed. by L.A. Withers; P.G. Alderson. London, Butterworths. p.277-283.
- STEVENSON, T.T.; CLELAND, R.E. 1981. Osmoregulation in the Avena coleoptile in relation to auxin and growth. *Plant Physiology (EF.UU.)* 67(4):749-753.
- STEWART, F.C.; ISRAEL, H.W.; MOTT, R.L.; WILSON, H.J.; KRIKORIAN, A.D. 1975. Observations on growth and morphogenesis in cultured cells of carrot (Daucus carota L.). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Ser. B (G.B.)* 273(922):33-53.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S.M.C.; FURTADO, J.S. 1980. Effect of GA₃ and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. *Journal of Experimental Botany (O.B.)* 31(125):1643-1649.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. 1979. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 46(2):184-190.

-----; MISAWA, M. 1980. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 48(1):121-125.

-----; MISAWA, M. 1981. Mass propagation of *Begonia X hiemalis* plantlets by shake cultures. *Plant and Cell Physiology (Japan)* 22(3):461-467.

THOMAS, A.S. 1937. Some observations on the hygroscopic properties of dried coffee beans. *The East African Agricultural Journal (Kenia)* 3(2):147-152.

THOMPSON, H.R.; THORPE, T.A. 1981. Marmitol metabolism in cell cultures. *Plant Physiology (EE.UU.)* 67(4, Supplement):27, abstract no.111.

THORPE, T.A.; MEIER, D.D. 1973. Sucrose metabolism during tobacco callus growth. *Phytochemistry (G.B.)* 12(3):493-497.

-----, 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. In *Perspectives in plant cell and tissue culture*. Ed. by I.K. Vasil. New York, Academic Press. p.71-111. (International Review of Cytology, Supplement 11A).

-----, 1985. Carbohydrate utilization and metabolism. In *Tissue Culture in Forestry*. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Duncan. 2nd. ed. Dordrecht. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk. p.325-368.

-----; JOY, R.W.IV; JEUNG, O.W.H. 1986. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 66(1):58-62.

-----; PATEL, K.R. 1986. Comparative morpho-histological studies on the sites of shoot initiation in various conifer explants. *New Zealand Journal of Forestry Science (Nueva Zelanda)* 16(3):257-268.

- TRAN THANH VAN, K. 1977. Regulation of morphogenesis. In Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application. International Congress on Medicinal Plant Research, Section B. (1., 1976, Munich). Proceedings. Ed. by W. Barz; E. Reinhard; M.H. Zenk. Berlin, Springer. p.367-385. (Proceedings in Life Sciences).
- TRIP, P.; KROTKOV, D.; NELSON, C.D. 1964. Metabolism of mannitol in higher plants. American Journal of Botany (E.E.U.U.) 51(8):828-835.
- UPPER, C.D.; HELGESON, G.T.; HABERLACH, G.T. 1970. Limitation of tobacco callus tissue growth by carbohydrate availability. Plant Physiology (E.E.U.U.) 46(1):118-122.
- VAID, I.F.N. 1976. Germination of coffee seeds (Coffea arabica L. cv. Mundo Novo). Journal of Experimental Botany 27(100):983-991.
- VAN DER PLAS, L.H.W.; WAGNER, M.J. 1984. Influence of osmotic stress on the respiration of potato tuber callus. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 62(3):398-403.
- VAN DER VOSSEN, H.A.N. 1980. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. Kenya Coffee (Kenia) 45(526):31-35.
- VASIL, V.; LU, C.-Y.; VASIL, I.K. 1983. Proliferation and plant regeneration from the nodal region of Zea mays L. (maize, Gramineae) embryos. American Journal of Botany (E.E.U.U.) 70(6):951-954.
- VASSEUR, J.; ROGER, V. 1983. Synthèses d'acides nucléiques et de protéines au cours de l'initiation de bourgeons adventifs sur des explantats de Cichorium intybus cultivés in vitro. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 57(4):485-491.
- ; LEFEBVRE, R.; BACKOUJA, E. 1987. Evolution des glucides intratissulaires au cours de la néoformation des bourgeons par des explantats racinaires de Cichorium intybus cultivés in vitro. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 69(4):597-601.
- VELASCO, J.R.; GUTIERREZ, J. 1974. Germination and its inhibition in coffee. The Philippine Journal of Science (Filipinas) 103(1):1-11.
- VERMA, D.C.; DOUGALL, D.K. 1977. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. Plant Physiology (E.E.U.U.) 59(1):81-85.

- VON ARNOLD, S.; HAKMAN, I. 1986. Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus cultures from mature zygotic embryos of Picea abies (L.) Karst. (norway spruce). Journal of Plant Physiology (Alemania) 122(3):261-265.
- 1987. Effect of sucrose on starch accumulation in and adventitious bud formation on embryos of Picea abies. Annals of Botany (G.B.) 59(1):15-22.
- WANAS, U.H.; CALLOW, J.A.; WITHERS, L.A. 1986. Growth limitation for the conservation of pear genotypes. In Plant tissue culture and its agricultural applications. Ed. by L.A. Withers; P.G. Alderson. London, Butterworths. p.285-289.
- WANG, T.L.; SMITH, C.H.; COOK, S.K.; ANBROSE, M.T.; HEDLEY, C.L. 1987. An analysis of seed development in Pisum sativum. 3. The relationship between the r locus, the water content and the osmotic potential of seed tissues in vivo and in vitro. Annals of Botany (G.B.) 59(1):73-80.
- WEBB, T.; ARMSTRONG, W. 1983. The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. Journal of Experimental Botany (G.B.) 34(143):579-603.
- WEBSTER, P.L.; HENRY, H. 1987. Sucrose regulation of protein synthesis in pea root meristems. Environmental and Experimental Botany (G.B.) 27(3):253-262.
- WEI, Z.M.; KYO, M.; HARADA, H. 1986. Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of Hordeum vulgare cv. 'Sabarlis'. Theoretical and Applied Genetics (Alemania) 72(2):252-255.
- WEIANDER, T. 1976. Effects of nitrogen, sucrose, IAA and kinetin on explants of Beta vulgaris L. growth in vitro. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 36(1):7-10.
- WELLMAN, F.L.; TOOLE, V.K. 1960. Coffee seed germination as affected by species, diseases, temperature and chemicals. Proceedings of the Caribbean Region, American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 4:1-6.
- WFSTCOTT, R.J. 1981a. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. Potato Research (Holanda) 24(3):331-342.
- 1981b. Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. Potato Research (Holanda) 24(3):343-352.

- WETHERELL, D.F. 1984. Enhanced embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda)* 3(3):221-227.
- WHITE, P.R. 1942. "Vegetable dynamics" and plant tissue cultures. *Plant Physiology (EE.UU.)* 17(2):153-164.
- WHITTIER, D.F.; STEEVES, T.A. 1960. The induction of apogamy in the bracken fern. *Canadian Journal of Botany (Can.)* 38(6):925-929.
- WITHERS, L.A. 1979. Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiology (EE.UU.)* 63(3):460-467.
- 1985. Cryopreservation of cultured cells and meristems. In *Cell culture and somatic cell genetics of plants. v.2. Cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation.* Ed. by I.K. Vasil. New York, Academic Press. p.253-316.
- 1987. Long-term preservation of plant cells, tissues and organs. In *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology v.4.* Ed. by B.J. Hiflin; H.F. Hiflin. Oxford, Oxford University Press. p.221-272.
- WOLFRON, M.J.; PLUNKETT, R.A.; LAVER, H.L. 1960. Coffee constituents: carbohydrates of the coffee bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (EE.UU.)* 8(1):58-65.
- ; PATIN, D.L. 1964. Isolation and characterization of cellulose in the coffee bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (EE.UU.)* 12(4):376-377.
- WOLTER, K.E.; SKOOG, F. 1966. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. *American Journal of Botany (EE.UU.)* 53(3):263-269.
- WONG, J.R.; SUSSEX, I.H. 1980. Isolation of abscisic acid-resistant variants from tobacco cell cultures. I. Physiological bases for selection. *Planta (Alemania)* 148(1):97-102.
- YEH, H.-I.; CHANG, W.C. 1986. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Ramhusa oldhamii* Hume). *Theoretical and Applied Genetics (Alemania)* 73(2):161-163.

- YEUNG, E.C.; BROWN, D.C.W. 1982. The osmotic environment of developing embryos of Phaseolus vulgaris cultivar Taylor's Horticultural. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie (Alemania) 106(P):149-156.
- YOSHIDA, F.; KOBAYASHI, T.; YOSHIDA, T. 1973. The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco. I. Effects of Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} , Cl^{-} and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. Plant and Cell Physiology (Japan) 14(2):329-339.
- ZAVALA, M.E.; SUSSEX, I.H. 1985. Survival of developing wheat embryos and bean axes following cryoprotection and freezing in liquid nitrogen. Journal of Plant Physiology (Alemania) 122(3):193-197.
- ZIEBUR, N.K.; BRINK, R.A.; GRAF, L.H.; STAHMANN, M.A. 1950. The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature Hordeum embryos. American Journal of Botany (E.E.UU.) 37(2):144-148.
- ZOK, S. 1986. La multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés par culture de méristèmes et d'apex. In Colloque Scientifique International sur le Café. (11., 1985, Lomé). Paris, Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). p.461-476.