ESTUDIOS EN POLEN Y POLINIZACIONES EN *Coffea arabica* L.

Por

WILSON CABRERA QUIROS

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA
Centro Tropical de Investigación y Enseñanza para Graduados
Turrialba, Costa Rica

Enero, 1962

ESTUDIOS EN POLEN Y POLINIZACIONES EN *Coffea arabica* L.

Tesis

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado

de

Magister Agriculturae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA: _____ Consejero

_____ Comité

_____ Comité

Enero, 1962

A LA MEMORIA DE MI ADORADA MADRE

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su profundo agradecimiento al Doctor Jorge León, su Consejero Principal, quien en todo momento le prestó su valiosa dirección y ayuda para la realización del presente trabajo de tesis. Agradece también la colaboración de los Doctores Carl C. Moh y Jorge Soria, Miembros de su Comité.

Al Doctor Ludwig Müller por el asesoramiento en los trabajos de microtecnia. A los Ingenieros Víctor Pérez y Belarmino Soto, de la Sección de Café del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, por haberle facilitado el campo experimental del ensayo con boro. A la señorita Vera Jiménez por el trabajo de mecanografía y al señor José Joaquín Córdoba por su ayuda en los trabajos de campo.

De un modo especial agradece a la Organización de Estados Americanos (OEA) por haberle otorgado la beca para efectuar estudios postgraduados en el IICA.

BIOGRAFIA

El autor nació en la Ciudad de Cajamarca, Perú, el 5 de abril de 1934. Realizó sus estudios primarios y secundarios su ciudad natal.

En 1953 ingresó a la Escuela Nacional de Agricultura de La Molina, graduándose de Ingeniero Agrónomo en febrero de 1958. Desde entonces ocupó el cargo de Ingeniero Asistente en el Instituto de Genética de la Sociedad Nacional Agraria del Perú. En octubre de 1960 ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica, para realizar estudios postgraduados en el Departamento de Fitotecnia, egresando en enero de 1962.

TABLA DE CONTENIDO

Página

LISTA DE LAMINAS v

LISTA DE CUADROS vi

LISTA DE GRAFICOS viii

INTRODUCCION 1

REVISION DE LITERATURA 3

1. Características generales del polen en cafeto . . . 3
2. Medios adecuados para la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico . . . . . .
   Conservación de polen 22
3. Los procesos de polinización en C. arabica L. . . . 30

MATERIALES Y METODOS 36

1. Determinación de las características generales del polen 36
   Forma y tipo de polen 36
   Tamaño 37
2. Pruebas de germinación del polen 38
   Conservación de polen 43
3. Polinizaciones en C. arabica L. 44

RESULTADOS 46

1. Características generales del polen 46
   Tamaño de los granos de polen de cafeto 50
2. Pruebas de germinación y conservación de polen . . 63
   Ensayos de germinación utilizando diferentes dosis de sacarosa y agar para determinar la concentración más adecuada para polen de C. arabica L. . 63
   Ensayos con ácido bórico 72
   Ensayo con ácido giberélico 77
   Ensayo con ácido naftaleno acético (ANA) 77
   Ensayos con estigmas macerados y anteras, y media antera 79
   Conservación del polen de cafeto 81
3. Polinizaciones en C. arabica L. 86

Página

DISCUSION 90

RESUMEN Y CONCLUSIONES 106

SUMMARY AND CONCLUSIONS 108

LITERATURA CITADA 110

LISTA DE LAMINAS

Lámina		Página
I.	Corte transversal de un grano de polen de *Coffea arabica* L. var. 'Typica', observado por contraste de fases	50
II.	Cortes transversales de polen de *Coffea arabica* L. var. 'Typica' mostrando algunos detalles de la exina e intina	51
III.	Grano de polen de *C. arabica* L. var. 'Typica' observado a foco alto, mostrando detalles de la escultura de la exina	52
IV.	Agar 0.5% y diferentes dosis de sacarosa	67
V.	Sacarosa 15% y diferentes dosis de agar	71
VI.	Efecto del ácido bórico a altas concentraciones .	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro Nº		Página
1	Dimensiones de granos de polen de diversas introducciones de C. arabica L., otras especies e híbridos	53
1-a	Distribución del tamaño promedio de granos de polen de C. arabica L.	60
2	Germinación del polen de C. arabica L. Primera prueba de tanteo utilizando 6 niveles de sacarosa y dosis mínimas de agar	64
3	Germinación de polen de C. arabica L. Segunda prueba de tanteo utilizando 4 niveles de agar y 6 de sacarosa. Promedio de 5 repeticiones. 4 Horas de germinación	66
4	Germinación y longitud de tubos polínicos de C. arabica L. en 10% de sacarosa y dosis variables de agar. Promedio de 5 repeticiones. 4 Horas de germinación	69
5	Germinación y longitud de tubos polínicos en C. arabica L. en 15% de sacarosa y dosis variables de agar. Promedio de 5 repeticiones. 4 Horas de germinación	70
6	Efecto del ácido bórico en la germinación y longitud de tubos polínicos de C. arabica L. Primer ensayo. 5 Repeticiones. 4 Horas de germinación	73
7	Efecto del ácido bórico en la germinación y longitud de tubos polínicos de C. arabica L. Segundo ensayo. 5 Repeticiones. 3 Horas de germinación	75
8	Efecto del ácido bórico como fertilizante en la longitud de los tubos polínicos. Muestras tomadas en el campo experimental en el cual se ensayan efectos de fertilizantes con y sin boro. 24 Horas de germinación	76

Página

Cuadro Nº

9 Efecto del ácido giberélico en la germinación y longitud de tubos polínicos de C. arabica L. (Promedio de 5 repeticiones). 3 Horas de germinación 78

10 Efecto del ácido naftaleno acético en la germinación de polen de C. arabica L. (Promedio de 5 repeticiones). 4 Horas de germinación . 79

11 Efecto de estigmas macerados y anteras en la germinación y longitud de los tubos de polen en C. arabica L. (Promedio de 5 repeticiones). 4 Horas de germinación 80

12 Efecto de las anteras en la germinación y longitud de los tubos de polen en C. arabica L. (Promedio de 8 repeticiones). 5 Horas de germinación 80

13 Efecto de sustancias desecantes en la conservación de polen en 'Typica' y 'Bourbon' . . . 83

14 Efecto de la polinización artificial en la fertilización de flores normales 87

15 Efecto de polinización artificial en flores semiabiertas 88

16 Efecto de polinización artificial utilizando polen irradiado 89

17 Cruzamiento real y características de la semilla obtenida con polen irradiado, expresados en porcentaje 89

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico Nº		Página
1	Efecto de 3 desecantes en la conservación de polen de 'Typica'	84
2	Efecto de 2 desecantes en la conservación de polen de 'Typica'	84
3	Efecto de 2 desecantes en la conservación de polen de 'Bourbon'	85
4	Efecto de 2 desecantes en la conservación de polen de 'Bourbon'	85
	Histograma que muestra la frecuencia de tamaño promedio de polen en 79 introducciones de *C. arabica* L.	62

INTRODUCCION

El conocimiento más amplio posible sobre la biología floral de la planta que se va a mejorar, es de importancia primaria para trabajos de fitomejoramiento. Esto elimina una serie de trabajos que pueden estar encaminados en forma errónea, evita gastos superfluos y permite ganar tiempo en la obtención de variedades superiores, debido a que se trabajaría sobre bases más seguras.

El cafeto es una planta que se cultiva en todas las regiones tropicales del mundo y la economía de muchos países latinoamericanos depende en su mayor parte de la exportación de café. A pesar de ello, los trabajos que se han realizado en lo que se refiere a la biología floral son relativamente pocos y aún son menos numerosos los realizados sobre las características y aspectos biológicos del polen mismo.

Teniendo en cuenta la necesidad de una cantidad abundante de polen para obtener una fertilización satisfactoria y por ende un buen rendimiento de frutos, el conocimiento de las cualidades del polen es un factor de gran importancia que no debe descuidarse.

Los estudios realizados sobre este tópico en polen de cafeto se han llevado a cabo más que todo para su utilización en forma inmediata en programas de mejoramiento, pero en *Coffea arabica* L. no se ha estudiado sistemáticamente la biología floral como en *Coffea dewevrei* y *Coffea canephora* var. 'Nana' por Dublin (19, 20) en Africa, o los llevados a cabo sobre características generales del polen de otras especies en particular.

Por esta razón el presente trabajo es una contribución al conocimiento de las características del polen y polinización en *C. arabica*.

Los principales objetivos que se persiguen en este estudio son:

1. Determinar las características generales del polen en C. arabica: tipo y forma, estructura de la exina y tamaño.
2. Determinar un método apropiado para conocer la viabilidad del polen y el efecto de ciertas sustancias promotoras de crecimiento sobre la germinación y longitud del tubo polínico y practicar ensayos de conservación de polen en C. arabica var. 'Typica'.
3. Comparar experimentalmente los procesos de polinización en C. arabica:
   a. Receptibilidad de los estigmas en flores normales
   b. Receptibilidad de los estigmas en flores que abren por la tarde
   c. Capacidad de fertilización de polen irradiado.

El ensayo de diferentes sustancias que favorecen el crecimiento se practica por primera vez en cafeto, lo mismo que las polinizaciones realizadas con polen irradiado. Esta polinización se ha hecho con el objeto de determinar si existe heterosis, basándonos en lo expuesto por Osborne (71), ya que ésta en café arábico es difícil de obtener por cruzamiento entre variedades. Este estudio servirá de base para otros posteriores que se lleven a cabo con mayor profundidad.

REVISION DE LITERATURA

A pesar de que los tres objetivos de este trabajo están estrechamente relacionados se ha creído conveniente dividir la Revisión de Literatura y capítulos posteriores en tres partes para su mejor exposición.

1. Características generales del polen en cafeto

Como ya se dijo anteriormente los trabajos llevados a cabo sobre polen en café son pocos y se han publicado esporádicamente en Brasil, Africa e Indonesia. Krug (44), después de medir el diámetro del polen en tres variedades de C. arabica (2 n = 44, 66 y 88 cromosomas) llegó a la conclusión de que en esta especie existe una gran variabilidad en el tamaño del polen. Así, el polen de la especie tetraploide (normal) varía de 28 a 44 micras con un coeficiente de variabilidad (C.V.) de 8%; el del hexaploide varía de 28 a 60 micras con un C.V. de 12.6% y el del octoploide de 24 a 56 micras con un C.V. de 12%. Estos datos nos demuestran la alta variabilidad del polen de los hexa y octoploides, debido posiblemente a la microsporogénesis anormal que es común en estas variedades de número cromosómico alto.

Mendes y Bacchi (58), midiendo 200 granos de polen de anteras que abrieron normalmente en C. arabica L. var. 'Monosperma' encontraron una variación de 14 a 55 micras con un C.V. de 29.35%, teniendo el promedio general 35.4 micras; sin embargo, los más frecuentes (50%) miden de 37 a 46 micras. La causa de esto lo atribuyen también a la microsporogénesis anormal, puesto que las células madres del polen dan un número variable de microsporas que varía desde 2 hasta 8.

Por estos datos se observa que sería imposible determinar el grado

de poliploidía por el tamaño de los granos de polen, característica que se presenta en otras especies; así, Bell (4) encontró gran variabilidad en el tamaño de los granos de polen en clones y plántulas heterocigotas de tomate, petunia, eneldo y verdolaga, cultivadas en diferentes soluciones nutritivas, y concluye diciendo que tal carácter no podrá usarse en taxonomía hasta que no hayan sido probadas o examinadas las correlaciones en cada caso por separado para poder ser válidas.

Sampath y Ramanathan (citados por Bell, 4) encontraron que los granos de polen de arroces cultivados son mucho más grandes que los de las especies silvestres y de dos especies poliploides. Ellos creen que la diferencia se debe a la combinación entre nutrición y herencia en las plantas silvestres y cultivadas.

Así mismo, los estudios biométricos de granos de polen en C. canephora dan a conocer la amplia variación en el tamaño del polen en esta especie. Por lo tanto, esta característica no podrá ser utilizada con fines sistemáticos para identificar a la especie (Mendes, 60), ni para diferenciar variedades de la var. 'Nana' (Dublin, 19). Sin embargo, en trabajos similares con C. dewevrei este último autor (20) cree que el diámetro del grano de polen puede ser utilizado con fines taxonómicos para distinguir clones o diferenciarlos unos de otros.

Flory y Tomes (29) encontraron una gran variabilidad en el tamaño del grano de polen en ciruelas y otras especies de Prunus, incluso de flor a flor dentro del mismo árbol; de allí que recomiendan mezclar bien las muestras que se tomen para determinar esta característica y lograr un índice varietal digno de confianza.

Bell (4) cita que varios investigadores han encontrado variaciones en el tamaño del polen de flor a flor, entre ellos: Ovcinnikov encontró

variación entre espiguillas en trigo, Kuprijanov encontró que el tamaño del polen varía de antera a antera en especies hortícolas (tomate, berenjena, cebolla, sandía, zanahoria, girasol y trigo); y Gould encontró variaciones en un grado elevado de acuerdo a la época de colección en clones de Andropogon.

Flory y Tomes (29), en cambio, encontraron coeficientes de correlación que indican una fuerte tendencia en las variedades de producir polen normal muy similar de año a año, e indican que las condiciones ambientales tampoco lo afectan en forma significativa dentro de una variedad.

Krug y Mendes (48) encontraron que el tamaño de 200 granos de polen en híbridos de C. arabica x C. canephora varían de 8 a 48 micras con un C.V. de 24.2%, con un promedio de 27.58 ± 6.66 micras; ellos atribuyen esto a la distribución irregular de los cromosomas en la meiosis.

En C. canephora Dublin (19) encontró que el diámetro del polen variaba de un individuo a otro pero en ningún caso la diferencia fue significativa. Los granos normales varían de 27 a 30 micras, pero existen granos gigantescos hasta de 45 que son posiblemente microsporas poliploides. Las mediciones para cada variedad se hicieron en alrededor de 500 granos previamente coloreados.

Dublin (20) en C. dewevrei midiendo 8744 granos de polen coloreados con fuccina ácida de Maneval en lactofenol, de 30 orígenes diferentes (variedades o clones) obtuvo un promedio de 26.02 ± 0.024 micras. Según este autor deben contarse alrededor de 300 granos por muestra, número suficiente para dar un C.V. inferior a 7% que en estos casos es aceptable.

En cambio, Medina y Conagin Mendes (56) midieron 100 granos de 17

plantas de C. dewevrei previamente coloreados con acetocarmín, encontrando que el diámetro varía de 19.32 a 35.14 micras, con un promedio de 29.44 micras, tamaño que según ellos es mucho menor que el de C. arabica que es de 36.79 micras y prácticamente igual al de C. canephora.

Selling (81) en sus estudios de polen realizados en Hawaii utilizó 10 granos por muestra, pero hace hincapié en que este número es insuficiente para establecer comparaciones estrechas en polen, pero que los valores obtenidos así dan una idea preliminar de condiciones de tamaño.

Estudios sobre características morfológicas del grano de polen en C. arabica no existen en la literatura; Krug (43) únicamente se limita a mencionar aspectos muy generales del mismo, tales como que no es pegajoso y puede ser llevado fácilmente por el viento. En cambio, otras especies de café han sido estudiadas en forma más detallada por Dublin (19, 20).

2. Medios adecuados para la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico

La determinación de la viabilidad del polen por métodos colorimétricos ha venido cayendo en desuso, ya que los datos obtenidos usando esta técnica no dan un índice de seguridad de la capacidad de fertilización del polen. Muchas veces el polen que ha perdido su poder germinativo se colorea perfectamente (Oberle y Watson, 67; King, 39), y a la inversa el polen que no se colorea muy bien germina con facilidad. Por esta razón los investigadores han tratado de buscar métodos para determinar la viabilidad real de una muestra de polen, unas veces ensayando nuevas sustancias que por lo menos den aproximadamente la capacidad de germinación (67, 77) y otras veces ensayando diferentes sustancias que favorecen el crecimiento de otros órganos de la planta, las cuales son

añadidas en concentraciones diferentes al medio básico de cultivo constituído generalmente por sacarosa y agar.

King (39) ha preconizado el valor de la reacción de la peroxidasa para determinar el poder germinativo de los granos de polen, técnica ya usada con anterioridad por Ostapenko (citado por King, 39). Esta prueba se basa en la oxidación de la benzidina por acción de la peroxidasa del grano de polen en presencia de H_2O_2 con liberación de O_2 por la catalasa. Sin embargo, ella tiene sus limitaciones, porque como dice este autor la reacción es específica para cada clase de polen, aunque el de especies estrechamente relacionadas parecen dar reacciones similares.

Varas (93) usó este método para comparar la validez de la misma en la determinación de la viabilidad de polen de cacao, comparándola con pruebas de germinación in vitro después de haber determinado con anterioridad el medio más apropiado de germinación constituído por sucrosa y agar con pH controlado, obteniendo porcentajes un poco más bajos, pero estadísticamente iguales; la falla de este método se notó en que polen muerto dio 16.3% de granos coloreados y cero en las pruebas de germinación.

Ensayos de viabilidad del polen que más acercan a la realidad son los llevados a cabo en medios de cultivo adecuados, constituídos generalmente por agua, azúcar (casi siempre sacarosa) y agar, siendo las concentraciones óptimas específicas para cada especie. Knowlton (41) y Resnik (77) dan evidencia de que el polen puede germinar en agua pura y citan a Von Molh, quien en 1834 logró hacer germinar polen de Morina sp. en agua pura; a Adams y Knight que hicieron lo mismo con polen de manzano. Estos casos son excepcionales porque generalmente los granos de polen puestos en agua revientan debido al DPD que hay entre el

agua y las sustancias que se encuentran como constituyentes de las microsporas, lo cual hace que el agua penetre en gran cantidad dentro de las mismas, y ejerza una presión tan fuerte que las membranas que las protegen no tienen la capacidad suficiente de resistirla, originando la rotura de las mismas y del tubo polínico cuando éste tiene la oportunidad de desarrollarse.

Una manera de contrarrestar este fenómeno es la adición de sacarosa y agar, teniendo también la primera la función de nutrir al grano de polen durante el proceso de la germinación, como lo ha demostrado O'Kelley (68), quien ensayando una serie de azúcares encontró que el 36% de CO_2 producido por la respiración del tubo polínico, proviene de la glucosa del medio, 66% de la fructosa y 72% de la sacarosa, sustancias que fueron probadas por separado.

Resnik (77) resume en tres las principales funciones del sustrato germinativo: a) provisión de agua, b) provisión de sustancias alimenticias, c) influencia estimulativa (o inhibitoria).

Medios de cultivo constituídos tan sólo por agua y sacarosa han sido utilizados con polen de varias plantas (5, 13, 50, 51, 68, 70, 75, 82, 83, 89), generalmente empleando la técnica de "gota colgante" o en placas de depresión. También con polen de C. canephora se ha utilizado esta técnica (18, 27). Smith (84) demostró experimentalmente que por este método se disminuye el crecimiento del tubo polínico; en Tradescantia, por ejemplo, después de un período de 4 horas de germinación se notó que el crecimiento del tubo polínico es tan sólo la mitad de lo conseguido con sacarosa y agar.

La mayoría de los sustratos germinativos por esta razón siempre contienen una mezcla de gelatina o agar y un azúcar, que condicionan

un medio en el cual germinan perfectamente los granos de polen y se obtienen tubos rectos, bien conformados y que no revientan.

Buscando el mejor método para hacer germinar polen de Antirrhinun y maíz Knowlton (41) encontró que para la primera especie son favorables concentraciones de 15 a 25% de sacarosa y para la segunda 0.7% de agar y 15% de sacarosa.

Para polen de papaya conservado, Traub y O'Rork (90) encontraron que el medio adecuado era 4% de sacarosa y 0.75% de agar y Cooper (13) empleó en sus experimentos el mismo porcentaje de sacarosa pero sin agar.

En especies frutales pertenecientes a los géneros Pyrus y Malus, Nebel y Ruttle (64) emplearon como medio de cultivo concentraciones de agar al 0.7% variando la sacarosa de 10 a 20%; King y Hesse (40), y Griggs, Vansell e Iwakiri (32) para determinar también la viabilidad de polen almacenado usaron 15% de sacarosa y 0.2% de agar. En cambio, Thompson y Batjer (89) utilizaron solamente 10% de sacarosa como medio básico de germinación para polen de frutales deciduos.

Smith (84) en sus estudios sobre crecimiento de polen en relación con temperatura y sustancias que promueven el desarrollo usó 10% de azúcar y 0.7% de agar para Antirrhinun, y 3% de azúcar y 0.7% de agar para Bryophyllum.

La máxima germinación del polen de Saccharum spontaneum y una variedad de maíz fue lograda con 1% de agar y 25% de sucrosa para la primera, y 1.5% de agar y 18% de sucrosa para la segunda (78). Este último medio como se ve difiere del encontrado por Knowlton (41) y del de Andronescu (citado por Knowlton 41, y Resnik 77), quienes aseguran que el sustrato germinativo ideal para polen de maíz es 10% de sucrosa y 0.7% de agar.

Fernholz y Hines (26) encontraron que el polen de tung germina mejor en medios que contienen 10% de sacarosa y 0.7% de agar.

Stone y otros (87) aseguran que el mejor sustrato germinativo para determinar la viabilidad del polen de diferentes especies del género Pistacia fue de 10 a 20% de sucrosa y gelatina azúcar-agar.

Los resultados de viabilidad del polen de Cinchona estudiados por Pfeifer (75) demuestran que no hay diferencia entre la concentración de azúcar; sin embargo, puntualiza que las mejores son 7, 10 y 12% de sucrosa y 1% de agar.

En polen de vid también se han efectuado estudios de germinación por algunos investigadores. Singh (82) ensayando diferentes concentraciones de sacarosa encontró que la mejor era 25%, medio que según él sería el ideal para poder determinar la viabilidad del polen de parras bajo las condiciones de Saharampur. Sin embargo, Winkler citado por Olmo (70) dice que la concentración óptima para la germinación del polen de vid era 20% de sucrosa, la cual fue usada en sus estudios por el propio Olmo para determinar la viabilidad de polen conservado. Estos datos contradicen los encontrados por Ziegler y Branscheit que obtuvieron la máxima germinación con 2.5% de sacarosa y Golmich con 5% de sacarosa y 2% de agar; estos dos últimos autores citados por Singh (59).

Efectuando ensayos con diferentes concentraciones de sacarosa (5 a 50%) para determinar la solución adecuada que asegure una buena germinación de polen de Citrus, Resnik (77) encontró que en todas las variedades ensayadas, a excepción de Shamouti, la germinación se incrementa con el aumento de concentración.

Estudiando el efecto de giberelina en polen de Lilium, Kato (38)

empleó como testigo un medio básico constituído por 2% de agar y 8% de sacarosa.

Nambiar (62) para sus estudios de viabilidad de polen irradiado de cocotero empleó un medio de cultivo constituído por 10% de sacarosa y 2% de gelatina, concentración con la cual se logra una buena germinación que fue más notable con la adición de ácido bórico al 0.5%.

Vasil (94) probando el efecto de diferentes azúcares sobre la germinación de polen de 8 miembros de la familia de las Cucurbitáceas encontró que la sacarosa era mejor.

Como se puede apreciar por todos los resultados expuestos anteriormente las concentraciones de agar y sacarosa empleadas en la germinación del polen de diferentes especies varían aunque no en un rango muy amplio; generalmente la sacarosa oscila entre 10 y 20% y el agar de 1 a 2%, con algunas excepciones. Con medios así balanceados se ha logrado hacer germinar polen de la generalidad de las especies; sin embargo, existen tipos de polen que no germinan in vitro como sucede con el de aguacate. Schroeder (80) hizo numerosos intentos para lograrlo pero fracasó; el hecho de que el polen de esta especie germina sobre los estigmas de otras plantas y a la vez que el polen de otras plantas germina sobre estigmas de aguacate, indican que en el medio de cultivo falta alguna sustancia esencial o alguna condición para que el polen pueda germinar. Por esta razón el autor ensayó también el efecto de sustancias suplementarias tales como extracto de levadura, vitamina B_1 y estigmas macerados, los cuales fueron incluídos en el sustrato germinativo, pero todos dieron resultados negativos.

Hace mucho tiempo que se vienen ensayando sustancias suplementarias tales como fermento de levadura, fragmentos de diferentes partes de

pistilo, compuestos promotores de crecimiento, etc., los cuales son añadidos a los medios básicos de cultivo con el objeto de lograr una mejor germinación del polen y un buen desarrollo del tubo polínico.

Brink (7) en 1924 fue el primero que empezó a usar en medios de cultivo extracto estéril de levadura, que según sus propias experiencias es una sustancia que favorece el incremento del tubo polínico y desde entonces ha sido empleada por muchos investigadores, entre otros Tsao (91), Pfeifer (72, 73, 74 y 75), Tulecke (92), Flory y Tomes (29).

Brink (7) también ensayó otras sustancias como jugo de papa cruda, extractos de gineceo, sales inorgánicas nitrogenadas, de las cuales solamente las dos primeras dieron buenos resultados.

En relación con el efecto de las partes de pistilo adicionadas al medio para lograr lo antes expuesto también se llevaron a cabo estudios de quimiotropismo o polaridad. Según Knowlton (41) los primeros investigadores que estudiaron la influencia de porciones de pistilo sobre la germinación, crecimiento del tubo polínico y quimiotropismo fueron probablemente Molish en 1893 y Lindforss en 1896, quienes informaron que los estigmas añadidos al medio germinativo ejercían una acción estimulativa muy fuerte y además que el polen de algunas especies presentó quimiotropismo hacia el azúcar, preparaciones diastásicas y a la albúmina de huevo. Sin embargo, Brink (7) en su revisión exhaustiva que hizo sobre quimiotropismo empieza citando a Van Tieghem, quien en 1869 consideró al hidrotropismo como el causante del crecimiento del tubo polínico en el tejido estilar; cita también a Strasburger (1878) quien en Torenia no encontró quimiotropismo hacia los óvulos; continúa con Correns (1889), quien en dos formas de Primula no encontró reacción quimiotrópica; y después cita a Molish (1893), investigador que encontró

una influencia quimiotrópica de los tubos hacia el estigma, partes del peciolo y flor, al micrópilo y funículo del óvulo en Narcissus tazetta.

Knowlton (41) informa también que una parte pequeña del estigma añadido al medio de cultivo estimula la germinación de polen de Antirrhinun y encontró también marcado quimiotropismo de los tubos hacia el estigma. Estos estudios fueron corroborados por Brink (7), quien encontró que esta especie presentaba quimiotropismo hacia el estigma, y en Narcissus a la placenta, epidermis interior del ovario y óvulos. También informa que el azúcar y levadura no tenían aptitud para atraer a los tubos polínicos. Observó, además, que el agrupamiento del polen ocasionaba un incremento de 44.5% en la longitud de los tubos, resultado que lo condujo a ensayar polen machacado agregado al medio, con resultados negativos.

El efecto de la agrupación sobre el incremento del crecimiento del tubo polínico y el porcentaje de germinación en diferentes especies ha sido demostrado por Addicott (1), y Ariyasu (2).

Otros autores han encontrado efectos quimiotrópicos, Tsao (91), ensayando 36 especies observó que solamente 9 presentaban quimiotropismo hacia estigma, estilo, pared del ovario y óvulos. También este autor estudió dicho fenómeno empleando diferentes sustancias informadas como tales, lo mismo que otros compuestos útiles en el metabolismo de las plantas (sucrosa, minerales esenciales, vitaminas, ácidos orgánicos, peptonas, caseína, AIA, y otras sustancias nitrogenadas), sin ningún resultado, lo que lo hizo suponer que la sustancia que ocasiona el quimiotropismo probablemente no es de naturaleza nutritiva, y postula que el mecanismo quimiotrópico en los tubos polínicos se debe a que dicho compuesto activo puede inhibir directa o indirectamente la extensibilidad

de las paredes del tubo, controlando así la dirección del crecimiento.

Link y Blaydes (49) encontraron que el polen de Aloe confusa presentaba quimiotropismo hacia el estigma, estilo, pétalos y sépalos; el de Clivia nobilis al estigma, estilo, paredes del ovario, óvulo, pétalos, sépalos e incluso hojas; el de Gasteria verrucosa hacia el estigma y ovario; y de Haworthia planifolia al estigma, estilo y ovario. Dichos autores creen que el factor causante de quimiotropismo en Clivia parece ser soluble en agua y difusible en agar. Consideraron como quimiotropismo positivo solamente cuando el 90% de los tubos se dirigía hacia la porción ensayada.

Las sustancias promotoras de crecimiento empleadas para lograr y aumentar la germinación del polen y desarrollo del tubo polínico están constituídas generalmente por elementos menores (B, Mn, Co), auxinas, vitaminas y otros compuestos orgánicos (colchicina).

Desde que Schmuker en 1933 (citado por Thompson y Batjer, 89; O'Kelley, 69; y otros) descubrió que el B en trazas ejercía un efecto estimulante en la germinación y crecimiento del tubo polínico varios autores han estudiado su comportamiento en polen de diferentes especies.

Thompson y Batjer (89) haciendo germinar polen de frutales deciduos en 10% de sacarosa y 10 ppm de ácido bórico encontraron que el B en esta concentración casi y a veces hasta doblaba el porcentaje de germinación; además, la longitud del tubo polínico fue incrementada de 2 a 10 veces sin mostrar anormalidades. Ensayaron también concentraciones de 2.5, 10, 40, 160 y 640 ppm de B sobre polen de peral, manzano y cerezo y encontraron que las mejores concentraciones fueron de 2.5 a 40 ppm. Las altas concentraciones (640 ppm) muestran una disminución muy notable e incluso, como en el polen de cerezo, previnieron su germinación.

Comparando la concentración de 10 ppm de B con algunas auxinas encontraron que el B es muy superior a estas sustancias.

Cooper (13) encontró que la lactoflavina natural incrementó el porcentaje de germinación del polen de papaya, y que aquélla contenía B por lo que los resultados obtenidos se podían deber al efecto combinado de la lactoflavina y B. Llegó a esta conclusión porque la lactoflavina sintética era activa solamente en una proporción igual a la mitad de la lograda con la natural.

Blaha y Schmidt (citados por Batjer y Thompson, 3, y otros) observaron un incremento muy alto en el porcentaje de germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en fresas y peral, pero no en ciruelo ni duraznero, cuando añadieron al medio de cultivo 0.0005% de ácido bórico.

Addicott (1) utilizó B en sus experimentos en una concentración de 0.01% en el medio básico empleado, el cual fue determinado previamente.

Aplicando ácido bórico en dosis de 5, 25 y 125 ppm sobre ramas de peral cuando la floración mostró de 40 a 60% de apertura de las flores, Batjer y Thompson (3) lograron una buena fructificación con las dos primeras. Según estos autores el efecto causado por el ácido bórico se debe a tres razones: estimulación de la germinación del tubo polínico, efecto estimulante del B en la formación de auxinas durante el período inmediato a la floración, o a la corrección de deficiencia incipiente o temporal del B en el suelo.

O'Kelley (68) encontró que 2 y 10 ppm de B eran las mejores concentraciones para polen de Lonicera japonica y Tecoma radicans, y 10 ppm para polen de Nicotiana tabacum. Una observación muy importante de este autor es el hecho de que la lactosa, azúcar que no se encuentra en las plantas, permite la germinación del polen de estas tres especies; en

cambio en fructosa, azúcar que existe en todas las especies vegetales, el polen ni siquiera germinó.

Más tarde O'Kelley (69) llegó a la conclusión de que el B hasta 100 ppm estimula la respiración y la absorción de azúcares, pero en la longitud del tubo éste desempeña un rol específico que no se relaciona con dichos procesos, ya que el crecimiento del tubo es afectado generalmente cuando falta. El autor sugiere que el B estimula la síntesis de materiales pécticos en la pared celular del tubo y por lo tanto permite su elongación.

Resnik (77) encontró un efecto estimulante del ácido bórico en concentraciones de 10 y 100 ppm sobre la germinación del polen de limonero.

Según Raghavan y Baruah (76) la adición de AIA, AIB, ANA, ácido bórico, sulfato de manganeso, molibdato de amonio, sulfato de zinc y cloruro de oro, en concentraciones no letales, al medio básico constituído por sucrosa incrementa la germinación y la longitud del tubo polínico del polen de Areca catechu aún desde la primera hora de haber sido sembrado.

Bose (5) por su parte observó que el ácido bórico era muy superior a la quinetina y al AIA, pero a su vez inferior a la giberelina en el crecimiento del tubo polínico de arvejas. Así mismo, Vasil (94) informó que el ácido bórico en concentraciones de 0.005 a 0.02% y borax al 0.01% incrementan la germinación y crecimiento del tubo en forma notable, superior al logrado con otras sustancias reguladoras de crecimiento.

Yamada (97) encontró que el sulfato de cobalto en concentraciones de 10^{-5} y 5×10^{-4} M tiene un efecto estimulante sobre el crecimiento

del tubo polínico de Lilium, mientras que el sulfato de cobre lo hace a concentraciones de 10^{-6}. Ensayó también dos sustancias quelatadas pero ambas fueron tóxicas.

Kato (38) utilizando polen de Lilium estudió el efecto del ácido giberélico en comparación con el AIA sobre la germinación y crecimiento del tubo polínico. La mejor concentración de AG fue 50 mg/l, la cual dio longitudes 5 veces mayores que el control, en cambio el AIA fue definitivamente inhibidor en todas las concentraciones usadas (5 a 200 mg/l).

Chandler (11) estudió el efecto de diversas concentraciones de AG (31.25 a 1000 mg/l) en 27 plantas pertenecientes a 16 familias diferentes, encontrando incremento en el porcentaje de germinación y una marcada influencia en el crecimiento del tubo polínico solamente en 7 especies; 10 especies germinaron en el medio básico pero fueron inhibidas por la adición de AG y 9 no germinaron ni en el medio ni con AG.

Dandliker y otros (17) no encontraron ningún efecto estimulativo con AIA sobre polen de papaya en concentraciones de 0.1 a 100 gamma/cc, en cambio Smith (83) encontró que el AIA en concentraciones de 1:1 millón en polen de Polygonatum, Tradescantia, Lathyrus y Pinus produce un estímulo en la germinación de tal manera que el tubo polínico aparece en un tiempo considerablemente menor que el control, incrementa la longitud del tubo, induce un porcentaje de germinación más alto, y en el caso de Pinus el polen pudo germinar mientras que en el control no ocurrió germinación alguna.

Más tarde Smith (84) estudió el efecto de la temperatura, auxinas (AIA, AIB y ANA en concentraciones de 1:100000), colchicina (a 0.01%, 0.0005% y 0.1%) y vitamina B_1 (1:25000), sobre la germinación del polen

de Antirrhinun y Bryophyllum y encontró que las auxinas tuvieron efectos tóxicos, mala germinación, reventamiento y distorción de tubos. La colchicina fue muy mala tanto en la germinación como en la elongación del tubo. La vitamina B_1 no mostró ningún estímulo.

Resnik (77) en polen de limonero, halló influencia con la adición de AIB, 2-4-D y tiamina; la mayor longitud del tubo corresponde a la tiamina y AIB.

El AIA ensayado en dosis de 1:50000 y 1:10000 por Mashkin (51) con polen de cerezo, manzano, peral y membrillero demuestra que esta auxina en concentraciones de 1:50000 estimula la germinación y crecimiento del tubo polínico en todas las especies mencionadas.

Dandliker, Cooper y Traub (17) estudiaron el efecto de la vitamina B_1 sobre la germinación del polen de dos especies del género Carica, llegando a la conclusión de que a excepción de una variedad la germinación del polen de todas aumentó al añadir esta vitamina en estado cristalino y a concentraciones de 100 gamma/cc en comparación con el testigo, y sugieren que el principal efecto de la tiamina es acelerar la germinación, ya que el incremento fue mayor durante las dos primeras horas de la siembra.

Cooper (13) encontró también que el ácido ascórbico al igual que la lactoflavina natural fueron altamente efectivos para la germinación del polen de papaya; que el ácido nicotínico, AIA e hidrocloratos de aminoácidos eran ligeramente activos pero parece que la acción de estas sustancias se debe al pH.

Addicott (1) probó el efecto de 3 sustancias en estado puro, consideradas como factores de crecimiento sobre el porcentaje de germinación y longitud del tubo en polen de Tropaeolum y Milla. En la primera

especie citada sólo se incrementó la longitud del tubo por la adición de tiamina y α naftilacetamina. En la segunda especie se incrementó el porcentaje de germinación por ácido paraminobenzoico, inositol, uracilo y acenafteno; la longitud del tubo fue incrementada por riboflavina, ácido paraminobenzoico, pantotenato de calcio, piridoxina, AIA, tiamina, guanina, etc. En total solamente 16 sustancias mostraron efectos benéficos. Por estos resultados el autor concluye que la germinación y crecimiento del tubo polínico no son efectos relacionados, sino que son estimulados independientemente en contraposición a lo que dicen O'Kelley (69) y Dublin (20), quienes encontraron correlación entre ambas características.

Loo y Hwan (50) añadiendo sulfato de manganeso, AIA y colchicina al medio de cultivo que sirve de control en dosis que variaban de 10^{-10} a 10^{-5} en polen de Antirrhinun, Nicotiana, Thea, Allium, Brassica, Triticum, Hordeum, Zea y Oriza encontraron que el efecto del sulfato de manganeso y colchicina era mayor que el de AIA y éste a su vez (en concentraciones de 10^{-5}) fue superior al control tanto en la germinación como en la longitud del tubo polínico. Las mejores concentraciones fueron las más altas en el caso del sulfato de manganeso y de colchicina, y AIA en bajas; colchicina y sulfato de manganeso a bajas concentraciones fueron iguales.

Según Eigsti (23) los efectos fisiológicos de la colchicina sobre el polen son alargamiento del tubo polínico; incremento en el ancho de la pared del mismo; disminución del porcentaje de tubos reventados, y formación de ramas en éstos.

Otras sustancias no relacionadas con las descritas anteriormente también han sido ensayadas con el mismo objeto; así por ejemplo

Tulecke (92) encontró que el polen de Ginkgo biloba desarrolló mucho mejor cuando se agregó al medio de cultivo leche de coco, jugo de tomate y extracto de levadura.

Como ya se dijo en la introducción,no se ha utilizado ninguna de estas sustancias en polen de cafeto y solamente se han hecho pruebas de germinación usando medios azucarados, solos o con agar.

Sybenga (88) cita a Von Faber, quien en 1912 encontró que la concentración óptima de sacarosa en solución, o gel agar era 20% y el máximo 40 a 45%. No hubo diferencias significativas entre las especies; la germinación empezó después de 30 minutos; la glucosa se comportó al igual que la sacarosa, mientras que la arabinosa y lactosa fueron inferiores. Otros compuestos, como sales, tuvieron poco efecto o fueron deletéreos. También cita que De Haan en 1923, encontró que el medio germinativo más adecuado era de 5 a 10% de azúcar y 1.5% de gelatina en agua, pero la germinación y crecimiento del tubo polínico fueron mucho más rápidos en condiciones naturales.

Ferwerda (27) empleando la técnica de gota colgante en cámaras húmedas llegó a establecer que el mejor medio de cultivo para polen de C. robusta, C. excelsa, e híbridos interespecíficos de C. liberica x C. arabica, C. arabica x C. robusta y C. excelsa x C. robusta, es 15% de sacarosa en agua destilada. Cuando el polen de C. robusta y C. excelsa está fresco, germina del 70 al 85%, pero el de los híbridos no germina tan rápido, especialmente el de los cruces C. arabica x C. robusta y C. liberica x C. arabica.

Krug (44) sin especificar el medio de cultivo que utilizó,indica que en varias pruebas de germinación encontró de 20 a 30% de viabilidad en polen del octoploide C. arabica L. var. 'Bullata', a excepción de una

muestra que dio 64% y en el hexaploide de la misma variedad determinó 35% de germinación, y en un solo caso ésta fue de 55%. En las mismas condiciones el polen de C. arabica, normal, da 90% de germinación.

Más tarde Krug y Mendes (48) vuelven a citar que el porcentaje normal de germinación del C. arabica L. es de 90%, y que la germinación del polen del triploide, proveniente del cruce de C. arabica x C. canephora demuestra que es estéril en una proporción altísima.

Mendes (60) informa que el medio más adecuado para la germinación del polen de café es 10% de sacarosa y 0.5% de agar. En este medio obtuvo 55% de germinación del polen de C. canephora y 83% para C. arabica, anotando que el crecimiento de los tubos polínicos del primero es más lento que en el C. arabica.

Medina (53, 54) utilizó como medio básico de cultivo 0.5% de agar y 15% de sacarosa e informa que con él obtuvo 69% de germinación con polen de C. arabica L. var. 'Rugosa', porcentaje que según este autor es normal para C. arabica. La determinación la hizo después de 24 horas de haber sembrado el polen en cámaras húmedas a temperatura ambiente sobre una capa delgada de la solución.

Dublin (19) encontró que el polen del café 'Nana' puede germinar bien en una solución de glucosa o sacarosa en concentraciones muy variables, y que debido a una presión osmótica particularmente baja, germina sin dificultad en agua pura. Sin embargo, el óptimo de germinación se obtiene en solución de glucosa al 5%. Con esta concentración obtuvo después de 4 horas de germinación en cámaras de Malassez, a temperaturas de 25.6ºC, una longitud promedio de los tubos de 384.1 micras en comparación con 282.5 micras y 330.6 micras obtenidas con concentraciones de 5 y 10% de sacarosa respectivamente. En la glucosa al 10% la

longitud promedio baja a 228.2 micras, pero en 2.5% da un tamaño igual a 308.6 micras.

En la germinación de polen de café 'Excelsa' el mismo Dublin (20) empleando la técnica de gota colgante y utilizando concentraciones variables de sacarosa y glucosa, encontró que los granos germinan fácilmente en los diferentes medios azucarados, y en agua pura obtuvo hasta 60% de germinación. El porcentaje más alto logrado se obtuvo con 10% de sacarosa.

Medina y Conagin (56) emplearon para la determinación de la germinación del polen de C. canephora 10% de sacarosa y 0.5% de agar.

Devreux y otros (18) informan haber obtenido 90% de germinación con polen de C. canephora en soluciones de sacarosa a 1% sin adición de agar, debido a que las concentraciones dadas por Ferwerda (27) y Mendes (61) ellos no obtuvieron buenos resultados.

Conservación de Polen

El polen mantenido a temperatura y humedad ambiente generalmente pierde su viabilidad en poco tiempo; sin embargo, controlando estos dos factores es posible prolongar la vida de aquél por un período más o menos largo, dependiendo esta duración de la naturaleza misma del polen, la cual varía de especie a especie, por lo tanto el óptimo de temperatura y humedad necesarias para la conservación de un tipo de polen determinado es variable.

La importancia de mantener polen vivo es fundamental ya que permitirá la creación de bancos de polen, donde el mejorador tendrá material suficiente para efectuar cruzamientos entre plantas que crecen en lugares distantes, florecen en épocas diferentes, y le permitirá también repetir algunos cruzamientos en floraciones sucesivas. Uno de los aspectos

de gran interés en polinizaciones realizadas con polen conservado, es que se sugiere que con éste se pueden lograr mayor número de mutaciones, punto de vista sostenido por Cartledje, Murray y Blakeslee, citados por Nebel (63), quienes dicen que la proporción de mutación normal se incrementa al aumentar el tiempo de almacenamiento del polen.

La conservación de polen ha sido practicada por el hombre desde hace mucho tiempo; es muy conocido el hecho de que el polen mantenido en la misma panoja masculina de datilero era objeto de comercio siglos antes de Cristo, y que las inflorescencias masculinas eran conservadas en grutas naturales para polinizar en floraciones siguientes.

Knowlton (41) logró mantener polen de Antirrhinun a bajas temperaturas: 0 a -17ºC por un período no mayor de 161 días y polen de maíz 70 a 80 horas manteniendo la temperatura entre 5 y 10ºC y a humedades relativas de 50 a 80%. En cambio Sartoris (78) informa que el polen de esta última especie y de caña de azúcar, se conserva vivo por 10 días a 40ºC y a humedades de 90 a 100%.

Estudios sobre conservación de polen de plantas ornamentales han sido llevados a cabo por Pfeifer (72, 73, 74). Según esta autora el polen de Lilium puede conservarse por 7 meses y el de Amaryllis por 5 a 10ºC y a 35, 50 y 60% de humedad controlada por soluciones de ácido sulfúrico, lo mismo que en cápsulas de gelatina a -5 y -11ºC para la primera y segunda especies respectivamente. Estudios más extensivos utilizando otras sustancias reguladoras de humedad como cloruro de magnesio y cloruro de potasio, permitieron mantener vivo al polen de diferentes especies de Lilium la mayor parte del año (10 a 11 meses), y por un tiempo más largo en condiciones de 5 y -5ºC en cápsulas al vacío. La viabilidad del polen de Gladiolus puede ser prolongada de 8 a 10 semanas

almacenándolo en la humedad a 10ºC, y en humedades controladas por soluciones saturadas de carbonato de potasio o a 50% de humedad condicionada por soluciones de ácido sulfúrico.

Harrison (33) conservó polen de algodonero, colectado antes de la antesis o inmediatamente después de la apertura de las flores, durante 4 días en refrigeradora común.

El polen de papaya almacenado a 1ºC de temperatura y a humedades relativas de 10% mantiene su viabilidad por 5 meses, Traub y O'Rork (90).

Crawford (16) conservó polen de datilero con éxito por un año a temperaturas de 8ºF.

Duffield y Snow (22) almacenaron polen de pino rojo y blanco por un año a temperaturas de 0 a 4ºC y 50% de humedad relativa, época después de la cual todavía se obtuvo 80% de germinación.

El polen de vid, según Nebel y Ruttle (64), puede ser conservado por un período mayor de 2 años en temperaturas de 2 a 8ºC y 50% de humedad relativa condicionada por una solución de ácido sulfúrico y mantenido en la oscuridad. Sin embargo, Olmo (70) logró conservarlo por 4 años a temperaturas de -12ºC y 28% de humedad condicionada también por ácido sulfúrico.

Experimentos de conservación realizados por Schroeder (80) han demostrado que el polen de aguacate retiene su viabilidad por un período limitado. Polen de 2 variedades mantenido en un desecador con cloruro de calcio a 40ºF germinaron bien <u>in vivo</u>, una después de 32 días y la otra después de 89. El polen de una tercera variedad germinó después de 153 días de haber sido conservado a 59ºF.

Fernholz y Hines (26) almacenaron polen de tung en sus propias anteras o almacenando flores completas (pertenecientes a flores en 3

etapas de desarrollo: botón, madura y caídas) a 5ºC de temperatura y a humedades de 10, 40, 65, 90, 95 y 100%. El polen de los botones florales tuvo el porcentaje más alto de germinación y se conservó por más de 20 días, en cambio el polen de las flores abiertas y caídas al suelo dieron porcentajes de germinación bajísimos y murieron completamente antes de las 2 semanas de almacenamiento.

Stone y otros (87) informaron que el polen de 5 especies de Pistacia se conserva mejor a -1ºC y 21.5% de humedad.

Pfeifer (75) encontró que el polen de Cinchona puede conservarse aproximadamente por un año a 10ºC y a humedades relativas de 35 a 50% proporcionadas por soluciones de cloruro de magnesio, cloruro de calcio y ácido sulfúrico.

Conservando polen de Hemerocallis en refrigeradora (3ºC) sobre cloruro de zinc en frasco cerrado, Johnson y Griffiths (36) obtuvieron 76.6% de germinación después de 32 días y polinizaciones hechas después de 3 meses demuestran que éste está todavía vivo.

McGuirre (52) almacenó polen de tomate a 0, 10 y 20ºC sobre cloruro de calcio en frascos herméticamente cerrados y encontró que después de 366 días el polen conservado a 0ºC todavía produce frutos, pero concluye diciendo que el límite práctico para producir semillas viables con polen almacenado en estas condiciones parece ser 6 meses.

Soost y Cameron (85) encontraron que el período máximo de conservación de polen de naranjo trifoliado era 61 días a temperaturas de 4ºC sobre cloruro de calcio, pero dicen que solamente se obtienen semillas viables con polen conservado por no más de 36 días.

Resnik (77) almacenó polen de Shamouti, Poncirus trifoliata y Temple en condiciones diferentes de temperatura y también combinando la

temperatura con medio ambiente de CO_2, encontrando que el polen de P. trifoliata conserva más tiempo su viabilidad a -5ºC (más de 4 semanas); el CO_2 a esta misma temperatura tiene una influencia negativa sobre el polen de Temple y para el polen de Shamouti son favorables alta concentración de CO_2 y baja temperatura. Comparando la regulación de la humedad utilizando polen de Fortunella el autor llega a la conclusión de que el ácido sulfúrico es inaceptable para estos propósitos porque forma anhidridos que ocasionan efectos letales. Sobre cloruro de calcio y a -6ºC el polen de Fortunella permanece viable 10 semanas.

Entre los experimentos llevados a cabo con el objeto de conservar polen de frutales deciduos podemos citar a King y Hesse (40), quienes encontraron que la humedad relativa promedio más favorable era 25% y 36ºF de temperatura; en estas condiciones lograron mantener vivo polen de membrillero, damasco, abridor y ciruelo por más de 550 días. En cambio, Nebel y Ruttle (64) encontraron que la humedad relativa más adecuada era 50% en las temperaturas ensayadas (2 a 8ºC); en estas condiciones pudieron mantener polen de peral, manzano, ciruelo, duraznero y cerezo por más de 2 años. En otra publicación posterior Nebel (63) empleando esta misma humedad y temperaturas dice que el polen de manzano puede vivir más de 4 años y dar semillas viables, el de peral da semillas normales después de 3 años, el de un ciruelo hexaploide se conservó tan bien como los de peral y manzano al finalizar el tercer año de almacenamiento, el de cereza sobrevive hasta 5½ años y fertiliza bien hasta los 4 años, pero el de albaricoque mostró una notable degeneración después de 2 años. El autor cree que dentro de límites razonables el incremento del vigor o robustez de los poliploides permite aumentar la longevidad del polen, de allí que el polen de manzano y

peral n = 17, ciruelo n = 24 y cerezo agrio n = 16 se conserva mejor que el polen de duraznero y albaricoque que apenas tuvieron n = 8.

Bullock y Overley (8) probaron el efecto de 37 sustancias diferentes como diluyentes del polen en relación con el mantenimiento de su viabilidad, siendo las más promisoras leche descremada en polvo sin grasa, albúmina de huevo y licopodium, las cuales conservan la viabilidad del polen de cerezo y manzano por más de 7 meses con el mismo porcentaje de germinación; estos diluyentes se mezclaron bien en proporción de 75 y 25% de polen, y se almacenaron en frascos pequeños. Griggs y otros (32) almacenaron polen de diferentes variedades de Pyrus, Prunus y Olea en refrigeradora común, obteniendo buenos porcentajes de germinación en algunas especies por más de un año y en otras hasta casi 3 años.

Según Brewbaker (6) la dehiscencia de los granos de polen ocurre cuando éstos están en la etapa binucleada o trinucleada. En el primer caso los granos germinan rápidamente en el medio de cultivo, mientras que en el segundo son más difíciles de crecer in vitro; además dice que el polen binucleado se conserva fácilmente a menudo por muchos años mientras que los trinucleados raramente viven no más de una semana.

Las primeras experiencias llevadas a cabo para conservar polen de cafeto fueron realizadas posiblemente por Von Faber en 1912, citado por Sybenga (88). Este investigador pudo guardar polen en condiciones de germinación por unos cuantos días en humedades relativas de 90%, pero con humedad más baja condicionada por ácido sulfúrico el polen de C. arabica y C. canephora pudo ser conservado por 10 días y el de C. liberica por 8.

Arisz y Schweizer, citados por Ferwerda (28) lograron conservar

polen por un período de 4 semanas sobre pentóxido de fósforo con el objeto de efectuar cruces entre 'Robusta' y 'Arabica', cuando la floración no ocurrió al mismo tiempo.

Liebenberg, citado por Devreux y otros (18), informó que el poder germinativo del polen de C. canephora puede mantenerse 4 días en condiciones naturales y persiste después de 7 días de conservación en desecador.

Hille Ris Lambers, citado por Devreux y otros (18), conservó polen de esta misma especie sobre cal viva removiendo el polen de tiempo en tiempo para evitar las fermentaciones y la humedad. El estimó que así se puede mantener el poder germinativo del polen por 3 ó 4 semanas.

Ferwerda (27) informa que el polen de café 'Robusta', 'Excelsa' e híbridos interespecíficos mantenido en aire seco sin ninguna precaución germina bien después de 2 ó 3 días y puede mantenerse vivo hasta una semana pero no germina después de 10 días. Pero conservado en un desecador usando cal viva el poder germinativo y de fertilización se mantiene aún después de un mes y más.

Mayne, citado por Coste (14), informó que el polen pudo ser guardado por 4 días bajo condiciones secas.

Mendes (60) informó que la conservación del polen era mejor a 0ºC y 10% de humedad relativa, lograda con ácido sulfúrico. En estas condiciones logró conservar polen por 45 días con 10% de germinación pero concluye diciendo que como 10% de poder germinativo es muy bajo, puede decirse que el polen en esas condiciones no dura más de 6 días.

Dublin (19) conservó polen en tubos pequeños taponados con algodón, empleando como medio desecador ácido sulfúrico, actigel, cloruro de calcio y cloruro de magnesio en soluciones saturadas y a dos temperaturas:

ambiente 25.6ºC y en refrigeración 0 a 5ºC, informando que la mejor conservación se logró con cloruro de magnesio en atmósfera refrigerada. En estas condiciones logró conservar polen de café 'Nana' durante 9 meses con 54% de germinación.

Posteriormente Dublin (20) indica que el polen de 'Excelsa' pierde todo su poder germinativo a los 2 días siguientes a la antesis si se le conserva en laboratorio sin precauciones especiales. Por el contrario, en atmósfera refrigerada a 0ºC y en presencia de un desecante tal como cloruro de calcio o sílica gel, el poder germinativo se puede mantener sobre 50% por espacio de 3 meses y termina diciendo que con cloruro de magnesio y en refrigeración se podría mantener todavía más la duración del poder germinativo.

Medina y Conagin Mendes (56) conservaron polen de C. dewevrei en cajas de petri que contenían cloruro de calcio, colocadas en refrigeración a temperaturas de 3 a 5ºC. Determinaciones hechas cada 7 días mostraron que a los 42 y 49 días solamente hubo vestigios de germinación, y puede decirse que el polen de esta especie tiene una longevidad muy corta, puesto que después de los 7 días la germinación fue insignificante (3.56%) mientras que con polen fresco se obtuvo 24.97%.

Devreux y otros (18) encontraron que con sílica gel la deshidratación es insuficiente (45% de humedad es el mínimo obtenido) para el polen de C. canephora. A bajas temperaturas (6ºC) el poder germinativo decreció rápidamente. El mejor método para retener la viabilidad es la conservación en desecador sobre cloruro de calcio anhidro y a temperatura ordinaria (más o menos 25ºC). En estas condiciones se puede mantener el poder germinativo del polen 30 días, después de este período la germinación decrece rápidamente a 20% en pocos días.

3. Los procesos de polinización en C. arabica L.

Ervin Bawer clasificó a las plantas de acuerdo a su biología floral en 4 grupos. El café arábico caería dentro de la agrupación de plantas autógamas, debido a que es una planta prevalentemente autofértil, al contrario de lo que sucede con las especies C. canephora y C. liberica que son altamente autoinfértiles, las que se clasificarían dentro del grupo de plantas alógamas que no toleran la autofecundación.

En 1928 Zimmerman, citado por Krug y Carvalho (46) publicó una información general considerando la biología floral en café. Más tarde Taschdjian, citado por Krug y Carvalho (46) y Sybenga (88), encontró que en el C. arabica no había fecundación en el botón floral cerrado, que encerrando botones en bolsas de papel se obtiene una producción de frutos razonablemente buena y que los insectos y el viento son agentes que contribuyen a promover la fertilización. Además, fue el primer investigador que utilizó un marcador genético para determinar el grado de polinización cruzada en C. arabica; con este propósito usó el recesivo 'Purpurascens' obteniendo de 39 a 93% de polinización cruzada natural, lo que lo indujo a decir que esta especie es sumamente alógama a pesar de ser autofértil.

Krug (43) confirmó algunos de los puntos de vista de Taschdjian pero en otros estuvo completamente en desacuerdo. Según Krug (43) la autopolinización en C. arabica es normal debido a la morfología misma de la flor, además observó que los botones florales generalmente abren muy temprano en la mañana en los días con sol y que el polen cae después, siendo el estigma receptible en el momento de la apertura de las mismas, en cambio cuando los días son nublados los botones no abren pero la dehiscencia del polen ocurre normalmente sin estar influenciada por

las condiciones exteriores del medio ambiente. Hace mención también de que las flores son visitadas por abejas silvestres, avispas y mariposas, que el polen puede ser llevado por el viento o caer por gravedad de las flores de las ramas superiores a las de niveles inferiores.

Estos hechos hacen suponer que a pesar de la autogamia típica del C. arabica existen cruzamientos, motivo por el cual posteriormente se llevaron a cabo trabajos para determinar el grado de polinización cruzada.

Stoffels (86) en Africa hizo experimentos con el propósito de observar el porcentaje de autopolinización y cruzamiento en el C. arabica. Para investigar si efectivamente había autopolinización antes de la apertura de las flores castró 1388 botones, los cuales protegió con bolsas de muselina no parafinada obteniendo 8.7% de fructificación y de otros 1314 botones castrados protegidos con muselina parafinada obtuvo 10.7% de frutos; ambos porcentajes son más o menos iguales. Creyendo que tal vez el resultado obtenido se debía a una polinización posterior a la antesis repitió estos ensayos: emasculó 672 botones cubriéndolos con muselina parafinada, teniendo cuidado de evitar la existencia o entrada de los insectos dentro de las ramas cubiertas, por lo cual espolvoreó piretro antes de la castración, y en el punto de unión de la rama con la bolsa colocó una tela aislante; a los 5 días cortó 402 pistilos dejando solamente 270 enteros. Los resultados obtenidos fueron concluyentes: de los 672 botones castrados 61 habían sido fecundados antes de la apertura, o sea que la autofecundación de C. arabica previa a la antesis es 9%, cifra muy similar a la que encontró en los primeros experimentos; además, observó centenares de estambres antes de la eclosión y encontró algunos granos de polen sobre éstos. Estos estudios demuestran

en forma más concluyente lo que aseguraba Krug (43). Stoffels (86) demostró también que el transporte del polen por el viento es de poca importancia, pues no alcanza más allá de los 5 metros y concluye diciendo que la fecundación cruzada en C. arabica tiene poca oportunidad de producirse, la mayoría del polen cae de las flores superiores a las inferiores en un mismo árbol. Los granos de polen llevados por el viento caen bruscamente y por lo tanto la fecundación cruzada es mayor en las flores de la parte inferior que en las de la parte superior; las abejas intervienen poco en la fecundación, se ven pocas en un cafeto en floración y visitan generalmente flores de una misma rama, regresando después de visitar una decena de flores. Además para que puedan efectuar cruzamiento tendrían que encontrar flores recién abiertas y no fecundadas, lo cual es poco probable; las hormigas tampoco porque ellas se pasean solamente por el mismo árbol.

Los porcentajes de autopolinización encontrados por Krug (43) encerrando botones antes de la apertura con bolsas de papel craft fue 80%, en cambio Stoffels (86) cubriéndolos con muselina parafinada obtuvo 59.4%.

Krug (45) y Krug y Costa (47) llegaron a determinar de 40 a 50% de cruzamiento natural y ello lo atribuyen a la acción de los insectos, viento y gravedad; en estas determinaciones emplearon también el marcador 'Purpurascens'.

Vicente (95) informó que en 1927 se hizo el siguiente experimento: se cogieron 6 ramas de una sola planta, las cuales se cubrieron con muselina fina y se dejó una de testigo sin cubrir, obteniéndose la mayor fructificación en el testigo, lo que hace suponer que los insectos desempeñan un rol importante en la polinización de C. arabica, puesto que

las ramas cubiertas siempre quedaron sometidas a la acción del viento. Con relación a esto dice Sybenga (88): "Las condiciones experimentales no permiten establecer una conclusión".

Carvalho y Krug (10) utilizando el mutante 'Cera' como marcador (endosperma amarillo en el cual se presenta el fenómeno de xenia cuando es polinizado por un cafeto de endosperma verde normal) llegaron a determinar después de 3 años de estudio que la fecundación cruzada natural es de 7.3 a 9% y concluyen diciendo que la influencia del viento e insectos es prácticamente igual, siendo menor y más variable el efecto de la gravedad en dichos cruzamientos.

Krug y Carvalho (46) aseguran que el C. arabica es predominantemente autógamo, basándose en los porcentajes de cruzamiento obtenidos anteriormente, y que las diferencias obtenidas con el marcador 'Purpurascens' se deben más que todo a la forma en que se determinó. Así en el caso del 'Purpurascens', se hizo en base al número de plántulas híbridas obtenidas en almácigo, y en el caso del 'Cera' por el conteo de semilla híbrida verde. Por lo tanto, este último método es más seguro y concluyen diciendo que las flores de 'Purpurascens' son rosadas en lugar de blancas y menos abundantes que las de plantas de variedades comerciales como 'Cera'; estos hechos y tal vez las diferencias en la cantidad de polen producido podrían explicar la desigualdad en los porcentajes encontrados.

Elgueta (24) en Turrialba encontró que la autofecundación en C. arabica se lleva a cabo libremente, ya que encerrando 10 ramas florales y dejando otras tantas de testigo (libre polinización) obtuvo 24.06% y 36.08% de fructificación, datos que según él estadísticamente no son diferentes. Con el objeto de determinar la dehiscencia de las

anteras y caída del polen antes de la apertura de la flor, cortó el estigma de 695 botones florales sin abrir, obteniendo 95 frutos (13.7% de fructificación) y concluye que estos datos estarían de acuerdo con lo encontrado por Krug en el sentido de que la caída del polen se produce antes de la apertura de la flor, lo mismo que con lo encontrado por Stoffels (86).

Nogueira, Carvalho y Antunes Filho (66) haciendo estudios del efecto de las abejas en la polinización del café 'Bourbon' observaron que el rol de los insectos en promover la polinización e incrementar el rendimiento parece ser de importancia secundaria en esta variedad. La especie que más frecuentó las flores de café fue la Apis mellifera la cual entra en contacto con anteras y estigmas debido a su tamaño relativamente grande pero en días lluviosos éstas apenas colectan néctar y polen. Observaciones adicionales mostraron que las abejas silvestres así como el A. mellifera dan preferencia a las flores de C. dewevrei que son mayores que las de 'Bourbon' y tienen más perfume.

León en 1954, citado por Sybenga (88), haciendo estudios de biología floral concluyó que el C. arabica tiene 3 tipos de flores: (a) normales, con yemas de 17 a 22 mm. de largo antes de la antesis y de color blanco puro, las cuales abren temprano por la mañana logrando su completo desarrollo entre las 7 y 11 A.M.; en ellas la caída del polen comienza en Turrialba a la 1 A.M.; a las 3 A.M. 18 a 27% de las flores tienen polen abundante, y a las 7 A.M. muestran antesis el 92%. (b) Flores "estrellas", verdes y estériles; y (c) aquéllas constituídas por yemas de menos de 16 mm. en el momento de la antesis, las cuales tienden a abrirse en la tarde exponiendo un estigma bifurcado. En éstas el polen no se desprende sino hasta la mañana siguiente, y es una flor que

presenta todos los tipos intermediarios entre las normales y las verdes estériles.

Estudios sobre la polinización de C. canephora y C. dewevrei han demostrado que en estas especies la polinización se lleva a cabo más que todo por el viento e insectos, debido a que son autoincompatibles (Ferwerda 28, Mendes 61, Devreux y otros 18, Dublin 21, Medina y Conagin Mendes 56).

MATERIALES Y METODOS

1. Determinación de las características generales del polen

Forma y tipo de polen

Para determinar las características generales del grano de polen se utilizó material del cultivar 'Typica' de C. arabica L.

El polen fue tratado siguiendo la técnica recomendada por Woodehouse (96) a base de gelatina con glicerina y verde de metilo, y la de Erdtman (25) con aldehido acético y ácido sulfúrico concentrado. También se probaron diversos colorantes como safranina, verde rápido, aceto carmín y azul de algodón en lactofenol, unas veces individualmente y otras siguiendo la técnica recomendada por Johansen (35). Los mejores resultados se obtuvieron empleando los procedimientos dados por Erdtman. Los de Woodehouse en cambio, no permitieron establecer con precisión las esculturas del grano puesto que el verde de metilo colorea sin dejar visibles los detalles pequeños. Entre los colorantes el que mejor resultó fue el azul de algodón en lactofenol. El método propuesto por Johansen tampoco sirvió para estos propósitos.

Para determinar el tipo de punteadura de la exina se hicieron preparaciones con parafina siguiendo el método Nº IV de Sass (79), con algunas modificaciones en lo que se refiere al tiempo y concentración de la safranina, que en estos casos se redujo a un período de 30 minutos y a 0.5% de concentración; además, se utilizó la serie de butanol en lugar de la de etanol. Siguiendo el mismo procedimiento indicado por este autor, el grano se colorea tanto que no se puede ver ningún detalle en particular y es difícil de decolorar; por eso se cree que el método modificado de Sass, citado anteriormente, es el más adecuado para este tipo de estudio,a pesar de que el verde rápido no llegó a colorear la

intina como se esperaba.

Los cortes se hicieron graduando el micrótomo a 6 micras. Las observaciones se efectuaron con la ayuda de un microscopio de contraste de fases, lo mismo que las fotografías tomadas al aumento de 10 x 100. También se hicieron algunos estudios con la ayuda de un binocular tipo Zeis al mismo aumento.

Las observaciones microscópicas directas se hicieron en polen centrifugado, con binocular de tipo Zeis, siguiendo el método de análisis L.O. (Erdtman 25).

Tamaño

El 2 de febrero de 1961, día en que se inició una de las grandes floraciones en cafeto en Turrialba, se colectaron las flores que habían abierto por la mañana, en pequeñas bolsas de papel craft. Las muestras se tomaron de diferentes partes de plantas representativas de las diversas introducciones de cafeto hechas por el I.I.C.A., que se encuentran en la colección de especies y variedades.

En el laboratorio se procedió a preparar los portaobjetos de cada muestra, colocando primero en cada portaobjeto una gota lo suficientemente grande de azul de algodón en lactofenol, preparado según la fórmula de Fowell (31). Luego se cogieron 5 flores al azar de cada una de las cuales se extrajo una antera y se las pasaba rápidamente sobre la gota de colorante. Una vez pasada la última antera, se cubría con un cubreobjeto quedando la muestra de esta manera lista para estudiarse en días posteriores. Este colorante colorea nítidamente al polen, facilitando así su medición.

La mayoría de las muestras se tomaron de la especie C. arabica L. y en menor número de otras especies de cafeto e híbridos intervarietales

e interespecíficos, más que todo para fines comparativos. A C. arabica corresponden 79 muestras; a C. canephora 4; a C. eugenioides 3; a C. liberica 2; a C. racemosa 1; a C. salvatrix 1; a híbridos intervarietales 9 y a híbridos interespecíficos 14.

Se midieron al azar 50 granos de polen de cada muestra, contando solamente los que caían dentro de la escala micrométrica al mover el portaobjetos en un solo sentido, de derecha a izquierda, de adelante hacia atrás, y viceversa. Sin embargo, en el caso de algunos híbridos interespecíficos se midieron 100 granos y en 2 muestras un número menor de 50 debido a la falta de polen en las muestras preparadas. El microscopio utilizado para estas mediciones fue el mismo binocular descrito anteriormente, el cual fue calibrado al aumento de 10 x 43. Estas mediciones se realizaron en el transcurso de una semana tomando únicamente el eje polar de cada grano; luego se hizo la transformación a micras, se sacaron los promedios de cada muestra y se consideraron los rangos entre los cuales variaba el tamaño de los granos; también se calculó el error estandar de los items (9) o desviación estandar como le llaman otros autores y el coeficiente de variabilidad de cada una de las muestras.

2. Pruebas de germinación del polen

Para este fin se utilizó únicamente un lote del cultivar 'Typica' y se colectaron las flores el primer día de la florescencia, en las primeras horas de la mañana.

Se ensayaron las siguientes sustancias:

Agar en concentraciones de 0 a 3%

Sacarosa en concentraciones de 5 a 30%

Acido bórico en concentraciones de 10 a 200 ppm

Acido giberélico en concentraciones de 31.25 a 500 ppm

Acido naftaleno acético en concentraciones de 25 a 400 ppm

Estigmas y anteras añadidas al medio de cultivo.

En las pruebas de ensayo para determinar las mejores concentraciones de agar y sacarosa se utilizaron dosis que variaron de 0.083 a 3% para el agar y de 5 a 30% para la sacarosa. Se midió el porcentaje de germinación, pero se dio especial importancia a la longitud de los tubos polínicos. El polen empleado en estos experimentos procedió de diversas flores, de ahí que no se dará mucha importancia a los análisis de variancia de éstos por la amplia variación que pudo haber debido a que el polen tenía orígenes diferentes.

Determinadas las dos concentraciones de sacarosa más adecuadas se realizó un experimento manteniéndolas constantes variando únicamente el agar: 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2%; no se siguieron usando las dosis de 2.5 y 3% porque habían mostrado una germinación muy pobre en las dos primeras pruebas de tanteo.

Posteriormente se llevaron a cabo los ensayos con ácido bórico, ácido giberélico y ácido naftaleno acético, que han dado resultados satisfactorios aumentando el porcentaje de germinación y crecimiento del tubo polínico sobre polen de otras especies. Se ensayó también el efecto de estigmas macerados y anteras sobre la germinación y crecimiento de tubos. Todos estos experimentos tuvieron como control el medio más adecuado de sacarosa y agar ya determinado en el ensayo anterior.

El ácido bórico se probó ensayando primero dosis de 50, 100, 150 y 200 ppm y posteriormente empleando 10, 20, 30, 40 y 50 ppm. En relación con estas pruebas se hicieron ensayos de germinación utilizando polen de un experimento donde se prueba el efecto de ciertos fertilizantes

con y sin adición de ácido bórico, localizado en Heredia.

El ácido giberélico se ensayó en dosis de 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 ppm, dosis similares a las empleadas por Chandler (11). El período de germinación en estos dos experimentos fue de 3 horas porque se esperaba un rápido crecimiento de los tubos polínicos.

El efecto del ácido naftaleno acético se probó en dosis de 25, 50, 100, 200, 300 y 400 ppm.

Los ensayos de germinación usando estigmas macerados añadidos al medio de cultivo también se hicieron con el objeto de observar si existía o no polaridad (quimiotropismo) de los tubos hacia los estigmas, tal como se ha informado en otras especies (7, 49, 50).

Las anteras se probaron debido a que Varas (comunicación personal) en sus primeros estudios con polen de cacao dejaba como referencia en el medio de cultivo la antera de la cual procedía el polen sembrado y notó cierto grado de inhibición en la germinación. Por último para confirmar estas observaciones se hizo un ensayo comparativo con medios germinativos con y sin medias anteras.

Todos los experimentos de germinación se llevaron a cabo utilizando la siguiente técnica: se prepararon los portaobjetos delimitando un área en el centro del mismo con bordes de parafina, igual al de un cubreobjeto. En ella se colocaron 3 gotas de cada medio por ensayarse, logrando de esta manera que el sustrato germinativo forme una superficie delgada y suficientemente plana donde se puedan determinar con facilidad los granos germinados y tubos polínicos. El polen se colocó cogiendo con una pinza 1 a 1 dos anteras y pasándolas rápidamente por sobre la superficie lisa del medio; así se logra distribuir adecuadamente el polen. Los portaobjetos con el polen ya sembrado se colocaron en cámaras

húmedas de germinación, las cuales fueron preparadas en esta forma: en el fondo de ellas se puso una toalla de papel bien humedecida y sobre ésta se colocaron paralelamente 4 varillas en sentido horizontal, fijas a los extremos de la cámara. Sobre estas varillas se pusieron los portaobjetos distribuídos en 2 hileras separadas. En la parte inferior de la tapa también se colocó otra toalla de papel humedecida antes de cerrar la cámara, con el objeto de mantener un porcentaje de humedad relativamente alto dentro de las cámaras y favorecer así la germinación.

En todos los ensayos siguiendo el criterio de Olmo (70) y de Pfeifer (75), se contaron como germinados aquellos granos que presentaban un tubo cuya longitud era 3 veces más grande que el diámetro polar del grano; lo mismo se hizo en la determinación de la longitud de los tubos polínicos. Sin embargo, en los ensayos de tanteo y en el caso de ANA se contaron como germinados los que mostraban un pequeño mamelón; en los primeros se hizo esto porque en algunas concentraciones de azúcar y agar ensayadas el polen no germinó convenientemente y por la misma razón en el caso del ANA.

Cada uno de los ensayos realizados fue planeado adoptando el diseño de bloques al azar constituyendo cada portaobjeto una repetición de cada tratamiento, y el polen de dos flores de una misma axila constituía cada bloque. La mayoría de los experimentos constaron de 5 repeticiones. Por lo tanto, en cada uno se utilizó el polen de 10 flores. En el último experimento (efecto de media antera) cada tratamiento constó de 8 observaciones. Este diseño se adoptó con el objeto de controlar las variaciones que pudieran haber en el polen proveniente de diversas flores.

A excepción de las pruebas con ácido bórico y ácido giberélico y

otras en las cuales se prolongó el período de germinación por un tiempo más largo en la mayoría de los casos la germinación se detuvo después de 4 horas de haber sido sembrado el polen, añadiendo a cada portaobjeto 2 gotas de azul de algodón en lactofenol, el cual además favorece el conteo de los granos germinados y la medición de tubos ya que colorea en tal forma que da una nitidez notable e impide el desarrollo de hongos que interferirían estos estudios y cuya presencia es común en este tipo de trabajo.

El porcentaje de germinación se determinó contando alrededor de 100 granos por portaobjeto, enfocando al azar y considerando a todos los que aparecían en el campo microscópico. Cuando había mucho agrupamiento se movía en cualquier dirección dicho portaobjeto a fin de evitar ciertos errores en las contadas, y en las determinaciones de las longitudes de tubos, ya que Brink (7), Addicott (1), Smith (84), Ariyasu (2) y otros, encontraron mayor incremento en la longitud de los tubos cuando éstos estaban formando grupos.

La longitud de los tubos se determinó midiendo al azar 25 en cada portaobjeto. Para determinar estas dos características se utilizó el mismo binocular empleado en los estudios anteriores, a aumentos de 10 x 10, en cuyo caso cada división de la escala micrométrica es igual a 7.6 micras.

Los análisis de la variancia en el caso de porcentajes de germinación se hicieron convirtiendo estos valores a grados, utilizando para este fin la table de Bliss (34), y para las longitudes de los tubos polínicos se hizo sacando el promedio de los 25 tubos medidos en cada preparación.

Conservación de Polen

Estos estudios se llevaron a cabo en desecadores conteniendo cloruro de calcio, sílica gel y óxido de calcio. Se iniciaron el 18 de abril de 1961 y se prolongaron por un período de 80 días. Las flores utilizadas pertenecían al cultivar 'Typica' y 'Bourbon', y se colectaron el primer día en que se inició una de las floraciones. Cada una de éstas se dividió en dos grupos: de uno de ellos se extrajo el polen con la ayuda de un pincelito y del otro se cortaron las anteras. El polen extraído se colocó en tubitos de vidrio de 2.2 cm. de diámetro y 2 cm. de altura, y las anteras en frascos pequeños de 3 cm. de diámetro y 6.5 cm. de altura. En cada desecador se pusieron 2 tubitos con polen de 'Typica' y uno de 'Bourbon', lo mismo que 2 frascos con anteras de 'Typica' y uno de 'Bourbon'.

Los desecadores se dejaron a la temperatura de laboratorio y expuestos a luz perenne.

Cada 10 días se hizo una prueba de germinación en 4 portaobjetos para polen de 'Typica' y 2 para 'Bourbon', utilizando como medio de cultivo 10% de sacarosa y 0.2% de agar con el objeto de determinar la viabilidad del polen. El tiempo de germinación fue de 4 horas siguiendo los mismos procedimientos usados en las pruebas anteriores. El porcentaje de granos germinados se determinó contando alrededor de 100 granos y a su vez se midieron 25 tubos por portaobjeto. Las curvas de ambas características en cada variedad, se trazaron tomando el promedio general obtenido de los 4 y 2 portaobjetos respectivamente, de acuerdo a la variedad.

3. Polinizaciones en C. arabica L.

Las emasculaciones de los botones florales se hicieron empleando la siguiente técnica: con los dedos de la mano izquierda se tomaba cada botón y con la ayuda de un bisturí se daba un corte ligero a la altura del tubo de la corola. Luego se hacía un ligero movimiento de torción para desprender la parte superior del botón, y suavemente se halaba hacia arriba quedando únicamente el pistilo, ya que los estambres por ser epipétalos salían junto con la parte de la corola extraída.

En esta forma se castraron más de 25 botones en cada rama floral con el fin de que si algunos estigmas se malograban en el embolsado hubiera oportunidad de dejar únicamente 25 como se había planeado. Las bolsas utilizadas en estos experimentos fueron de papel craft, las cuales se ajustaron muy bien a las ramas para evitar la entrada de insectos que pudieran interferir en la polinización.

Se hicieron 3 experimentos. El primero para determinar la mayor receptibilidad en los botones de flores normales (León citado por Sybenga, 88) y la influencia de los agentes portadores de polen en la fertilización; con este propósito en 9 árboles del cultivar 'Bourbon' se aplicaron 4 tratamientos: botones emasculados y dejados a libre polinización; botones emasculados y embolsados para determinar el número de polinizaciones posibles antes de la apertura de la flor; botones emasculados embolsados y polinizados al siguiente día; y botones emasculados embolsados y polinizados al segundo y tercer día (doble polinización). Cada tratamiento fue hecho en 25 flores.

El segundo se realizó con el objeto de probar si efectivamente como sugiere León (citado por Sybenga, 88) las flores que abren por la tarde se polinizan al segundo día, o lo hacen el mismo día o en días posteriores. Para este propósito se ensayaron 3 tratamientos de 25 flores

cada uno, por repetición: flores semiabiertas marcadas que sirvieron de testigo; flores semiabiertas emasculadas y protegidas (embolsadas); flores semiabiertas emasculadas, protegidas y polinizadas al tercer día. Este ensayo se efectuó en 7 árboles del cultivar 'Pacas', cada uno de los cuales sirvió como una repetición del diseño planeado.

El tercer ensayo se efectuó para determinar el grado de fertilización de polen irradiado, ya que por este método se trata de averiguar si se induce o no heterosis (proyecto que se continuará más adelante); en este caso se utilizó como progenitor femenino el mutante 'Cera' y como masculino el cultivar 'Typica', polen del cual fue irradiado con dosis de 400r, 800r y 1600r. El polen se preparó en la siguiente forma: el día anterior a la apertura se colectaron en el campo ramas con botones florales que en el laboratorio se colocaron en vasos con agua. Al día siguiente las flores ya abiertas se pusieron en 4 bolsas pequeñas de papel craft, 3 de las cuales fueron sometidas a irradiación en el Campo Gamma del I.I.C.A. hasta recibir las dosis ya indicadas, y la restante sirvió como control. Inmediatamente después se procedió a hacer las polinizaciones en 7 árboles que habían sido señalados y preparados el día anterior, en cada uno de los cuales se aplicaron los 4 tratamientos.

Las polinizaciones se realizaron de la siguiente manera: se frotaba una antera sobre el estigma de la flor que iba a servir como progenitor femenino, repitiendo el mismo proceso, después del cual se procedía de nuevo a protegerlas por medio del embolsado. A los 8 días de esta operación se quitaron las bolsas.

Para fines de análisis estos experimentos fueron diseñados en bloques al azar; cada bloque estuvo constituído por un árbol y cada tratamiento se aplicó en las 25 flores de cada rama.

RESULTADOS

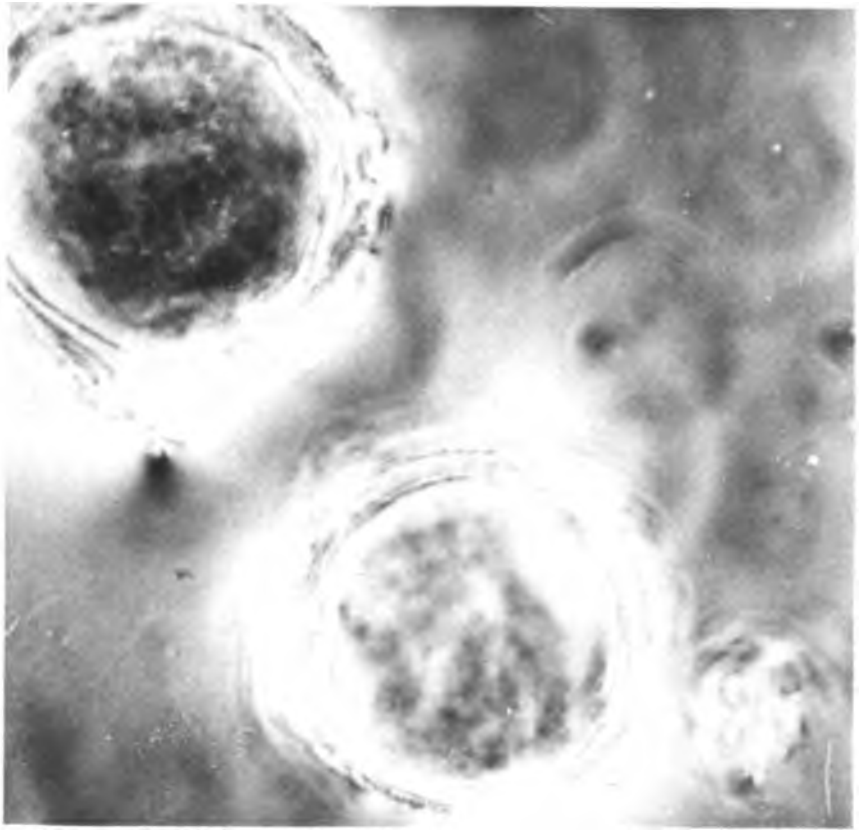
1. Características generales del polen

Los granos de polen de C. arabica son esféricos suboblados, tricolpados. Esta última característica no es permanente, pues se encuentran numerosos granos bicolpados, y en raras ocasiones tetracolpados. Colpas largas (más de tres cuartas partes del eje polar), angostos, agudos en los extremos, hundidos. Poros ecuatoriales, grandes, cuyo diámetro va de un quinto a un sétimo del eje polar. Los poros no son visibles en todas las preparaciones, pero en varias de ellas se puede determinar su posición, que coincide con la dada por Dublin (19) para Coffea canephora.

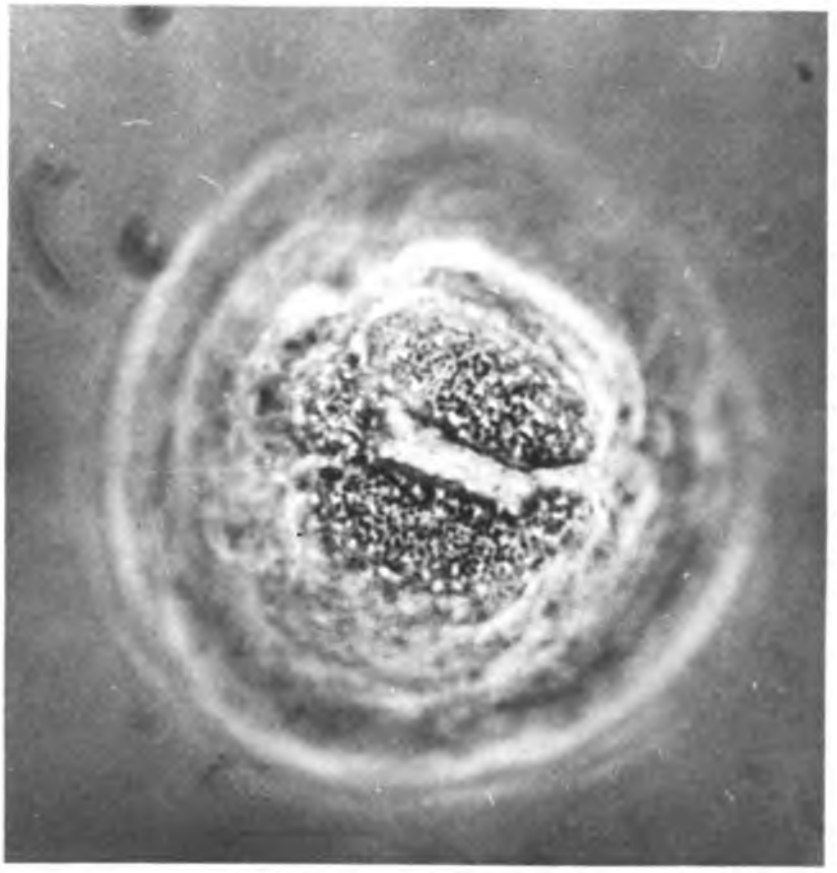
Las áreas mesocólpicas presentan una superficie regular. Al examen de luz (L.O.) al foco alto aparecen áreas oscuras, poco uniformes en tamaño y forma las que a foco bajo se tornan brillantes y rodeadas de una red continua de franjas oscuras. Esto revela una marcada estructura reticulada. Es de observar que algunas de las áreas son mucho mayores que las otras, pero que no presentan una distribución regular. La naturaleza del retículo no pudo ser determinada en detalle en los cortes al micrótomo de granos de 'Typica', ni en las preparaciones ordinarias, por carencia de un microscopio de alto poder de resolución. Sin embargo, las observaciones sobre márgenes quebrados permiten suponer que este grano ofrece posiblemente el tipo gemado de grabadura.

En la sección transversal la intina aparece como una zona clara, de una tercera parte del espesor total de la cubierta del grano. Dicha zona no aparece bajo las colpas. La exina está formada de dos zonas bien marcadas. La inferior es más clara, lo que sugiere que los pilares son angostos y espaciados. La zona externa es más densa y está formada

LAMINA I. Corte transversal de un grano de polen de *Cuffea ambigua* L. var. 'T[illegible]', [illegible] por contraste de fases.



LAMINA II. Cortes transversales de polen de Coffea arabica L. var. 'Typica' mostrando algunos detalles de la exina e intina.



LAMINA III. Grano de polen de C. arabica L. var. 'Typica' observado a foco alto, mostrando detalles de la escultura de la exina.

por una capa marcadamente gemada. El grosor de las capas de la intina es aproximadamente igual. Las fotografías al contraste de fases de las láminas I y II revelan apenas la estructura general sin mostrar detalles; la lámina III en cambio permite apreciar la escultura de la exina.

Tamaño de los granos de polen de cafeto

Las dimensiones de los granos de polen de café determinados en el presente estudio se hallan resumidas en el Cuadro Nº 1. En la primera columna se encuentran ordenadas alfabéticamente las especies y las introducciones de cada una de ellas. La segunda corresponde al rango dentro del cual variaron los tamaños de cada muestra, o sea el o los granos más pequeños y los más grandes. En la tercera columna se dan los promedios de 50 granos, con algunas excepciones que se indican al pie de dicho cuadro; estas dimensiones se hallan expresadas en micras. La cuarta columna corresponde al error estandar de las observaciones o items como lo llama Calzada Benza (9) o desviación estandar según otros autores (s). La quinta corresponde al coeficiente de variabilidad (C.V.).

En el Cuadro Nº 1-a en cambio, se encuentran ordenadas de acuerdo al promedio, las 79 introducciones de C. arabica, distribuídas en 12 clases cuyo intervalo de clase es de una micra.

Considerando el promedio de 50 granos, en el Cuadro Nº 1 se observa que el más bajo pertenece a la introducción 'F.840' (II - 3364_{2-2}), igual a 25.26 micras. Le siguen en orden ascendente las introducciones 'F.840' (II - 3364_{1-3}), 'Amfillo' (2564), 'Angustifolia' (915) y 'Mokka' (2313), 'Batie 1' (2250) y 'F.840' (II - 3364) con promedios de 25.44, 26.69, 27.77, 27.88, y 27.94 micras respectivamente. El promedio más alto corresponde a la progenie 'Tu. 279': 36.57 micras, siguiéndole en orden descendente 'Purpurascens' (986), 'Dessie' (2249), 'Typica' (Finca),

'S.L. 34' (2733) y '6/1' (1999) con 35.46, 34.70, 34.45, 34.13 y 34.03 micras respectivamente. Sin embargo la mayoría de las muestras tuvieron un promedio alrededor de las 30 micras. Calculando el promedio general de los 3950 granos medidos (79 introducciones), se obtiene un promedio de 31.23 micras con un error estandar de 3.27 micras, que sería el tamaño y variación del grano de polen de la especie C. arabica L.

Muestras de 'Murta' (2147) y 'Semperflorens' (2000) presentaron una variación muy pequeña; en esos casos el error estandar fue 1.782 y 1.866 respectivamente. Así mismo esta variación fue también baja en 'Typica' (Finca), 'Mucronata' (7 - 9), 'Filipino' (972), 'Villalobos' (2594 - 20), 'Erecta' x 'Murta' (11 - 1), 'Bourbon Rojo' (995), 'Preanger' (981), 'S.L. 9' (2730) y 'Purpurascens' (987_{3-2}).

Estas variaciones fueron altísimas en el caso de la introducción 'Cioiccie' (2710), en 'Monosperma', y 'Mundo Novo' (2544_{3-1}), cuyos errores estandar fueron 6.245, 5.525, y 5.518 respectivamente, a los cuales corresponden también los C.V. más altos dentro de la especie. Después siguen 'Tu. 279', 'F. 840' (II - 3364), 'F. 840' (II - 3364_{2-2}), 'Bourbon Amarillo' (2540), 'Jimma 2' (2247) y 'Geisha' (2917).

El tamaño absoluto de los granos individuales de polen varió mucho. Así en la introducción 'Jimma 2' (2247) se encontró un grano de polen de 10.44 micras aunque el tamaño promedio fue de 28.22 ± 4.22 para el cultivar. En orden ascendente se encontraron granos individuales con las siguientes dimensiones: 'Guadeloupe' (971) con 13.62 micras; 'S. 333' (3217) y 'Salvador' (996) con 15.66 micras. Cabe anotar que todos estos casos son excepcionales ya que las tendencias centrales son diferentes.

En el mismo cuadro observando los resultados obtenidos en las 4

introducciones de C. canephora, vemos que los promedios son muy uniformes, siendo el promedio general 26.31 micras. La variación más baja corresponde a 'Robusta SA 158' (3581_{2-1}) y la más alta al 'Purpurascens' (3418_{3-2}), en el cual también se observaron los granos más pequeños. En 'Purpurascens' (3480_{2-1}) se encontraron los granos más grandes.

Las 3 introducciones de C. eugenioides estudiadas muestran mucha uniformidad en sus promedios; lo mismo sucede en las 2 introducciones de C. liberica, pero en esta última especie se nota una variabilidad un poco más alta. En C. racemosa y C. salvatrix en cambio, la variación es bajísima incluso tan baja como en las introducciones 'Murta' y 'Semperflorens' de C. arabica.

En los híbridos intervarietales se observa que el promedio y el error estandar más altos, así como los granos más grandes, corresponden al cruzamiento F_2 de 'Padang' 975 x 'Bourbon Rojo' 995 (H_L 1-2). En cambio el C.V. más alto pertenece al cruce F_1 'H. 66' 2731 x 'Mundo Novo' (T_h 178).

El promedio más bajo corresponde al cruce de 'Laurina' x 'Maragogipe' (2311) y el error estandar y el C.V. más bajo al F_2 de 'Mucronata' x 'Padang' (984 - H_L 1-2).

En los híbridos interespecíficos se ve que el cruzamiento de C. liberica x C. arabica (2916) tiene el promedio más alto y en él se encuentran los granos más grandes. El promedio más bajo corresponde al F_1 de 'Villalobos' (2594) x 'Quillou' (146), lo mismo que los granos más pequeños y los errores estandar más altos. Estas dos últimas características son muy parecidas al mismo cruce (147). También tuvo un error estandar alto el cruce de C. liberica x C. arabica (3485).

En el Cuadro Nº 1 también se incluyen los resultados de las muestras

CUADRO Nº 1

DIMENSIONES DE GRANOS DE POLEN DE DIVERSAS INTRODUCCIONES DE *C. ARABICA* L., OTRAS ESPECIES E HIBRIDOS

	Rango		Promedio de 50 granos	Error estandar s	C.V.
C. arabica L.					
Abasamuele (2255)[1/]	26.10	36.54	30.28 ±	3.278	10.83
Agaro (2751)	22.62	36.54	30.52 ±	4.223	13.84
Amfillo (2754)	17.40	34.80	26.69 ±	3.972	14.88
Angustifolia (8-2)	20.88	38.28	32.05 ±	3.933	12.27
Angustifolia (9-9)	20.88	38.28	31.18 ±	3.991	12.80
Angustifolia (9-15)	22.62	33.06	27.77 ±	2.679	9.65
Arabigo (2138)	26.10	38.28	32.12 ±	2.708	8.43
B.A. 14 (2690)	24.36	45.24	31.01 ±	3.545	11.43
Batie 1 (2250)	20.88	33.06	27.88 ±	2.932	10.52
Blue Mountain (977)	22.62	34.80	29.68 ±	2.822	9.51
Bourbon (Finca)	27.84	38.28	31.67 ±	3.166	10.00
Bourbon (9-3)	26.10	40.02	33.69 ±	4.139	12.29
Bourbon Amarillo (2540)	22.62	40.02	33.06 ±	4.262	12.89
Bourbon Rojo (995)	26.10	34.80	31.18 ±	2.300	7.38
Bourbon Salvadoreño 2 (43)	26.10	36.54	29.16 ±	2.473	8.48
Bullata (8-7)	24.36	38.28	33.58 ±	3.484	10.38
Caturra Rojo (2308)	20.88	43.50	33.37 ±	3.078	9.22
Cera (3427)	26.10	36.54	31.08 ±	2.731	8.79

1/ Los números entre paréntesis corresponden al número de introducción.

Cuadro Nº 1 (Continuación)

	Rango		Promedio de 50 granos	Error estandar s	C.V.
Ceylan Hibrid (982)	17.40	34.80	29.51 ±	2.917	9.88
Cioiccie (2710)	19.14	43.50	28.43 ±	6.245	21.97
Dessie (2249)	24.36	41.76	34.70 ±	3.288	9.48
Erecta (2310)	26.10	36.54	30.94 ±	2.391	7.73
Erecta-Maragogipe (10-7)	24.36	41.76	31.18 ±	3.650	11.71
Erecta-Murta (11-1)	26.10	38.28	32.75 ±	2.321	7.09
Erecta-Typica (10-1)	27.84	38.28	33.90 ±	3.449	10.17
Etiopia (3524_{2-1})	22.62	38.28	29.34 ±	3.408	11.62
Et. Nº 15 (3530)	20.88	38.28	30.87 ±	3.179	10.30
Et. Nº 24 (3538)	22.62	38.28	32.12 ±	3.283	10.22
F. 840 (II - 3364)	19.14	34.80	27.94 ±	4.325	15.48
F. 840 (II - 3364_{1-3})	15.66	29.58	25.44 ±	3.021	11.88
F. 840 (II - 3364_{2-2})	17.40	31.32	25.26 ±	4.265	16.88
Filipino (972)	24.36	34.80	33.83 ±	2.373	7.01
Geisha (2917)	22.62	40.02	33.06 ±	4.219	12.76
Geisha (2722)	24.36	41.76	32.71 ±	4.055	12.40
Guadeloupe (971)	13.62 1/	34.80	28.78 ±	4.058	14.10
Guadeloupe (989)	22.62	34.80	29.68 ±	3.054	10.29
Gudar (2256)	24.36	34.80	30.35 ±	3.108	10.24
H. 1 (2715)	20.88	38.28	32.54 ±	3.608	11.09
Harrar (2918)	27.84	43.50	32.43 ±	3.098	9.55
Jimma 2 (2247)	10.44 2/	33.06	28.22 ±	4.222	14.96

1/ Un solo grano de 13.62, los otros más pequeños empiezan desde 20.88 μ.

2/ Un solo grano de 10.44, los otros más pequeños empiezan desde 26.10 μ.

Cuadro Nº 1 (Continuación)

	Rango		Promedio de 50 granos	Error estandar s	C.V.
Jimma 5 (2253)	24.36	38.28	31.53 ±	3.137	9.95
Kona (979)	20.88	36.54	31.25 ±	3.260	10.43
Local Bronze (2922)	20.88	38.28	31.01 ±	2.978	9.60
Le Roy (2140)	26.10	38.28	32.47 ±	2.448	7.54
Mibirizi (2702)	20.88	38.28	29.23 ±	4.514	15.44
Mokka (2313)	19.14	33.06	27.77 ±	3.202	11.53
Monosperma	17.40	36.54	29.34 ±	5.525	18.83
Mundo Novo (2544)	26.10	36.54	31.98 ±	2.509	7.85
Mundo Novo (2544_{3-1})	20.88	43.50	30.62 ±	5.518	18.02
Murta (1992)	27.84	38.28	33.06 ±	2.509	7.59
Murta (2147)	29.58	34.80	32.69 ±	1.782	5.45
Mucronata (7-9)	24.36	34.80	31.39 ±	2.110	6.72
Pacas (2942)	27.84	40.02	33.48 ±	2.690	8.03
Padang (975)	17.40	34.80	30.76 ±	2.864	9.31
Padang (992)	24.36	34.80	29.34 ±	2.509	8.55
Polysperma (3455)	19.14	36.59	29.20 ±	3.502	11.99
Preanger (981)	26.10	34.80	29.82 ±	2.308	7.74
Purpurascens (986)	26.10	45.24	35.46 ±	2.675	7.54
Purpurascens (987_{3-2})	27.84	38.28	32.40 ±	2.398	7.38
Purpurascens (987_{1-1})	27.84	38.28	32.09 ±	2.679	8.35
San Ramón (984 9-7)	24.36	43.50	32.26 ±	3.788	11.74
Semperflorens (2000)	29.58	36.54	32.19 ±	1.866	5.80

Cuadro Nº 1 (Continuación)

	Rango		Promedio de 50 granos		Error estandar s	C.V.
S. 288 (3216)	24.36	41.76	32.89	±	3.855	11.72
S. 333 (3217)	15.66 1/	38.28	31.46	±	3.716	11.81
S. 333 (3368)	26.10	40.02	31.63	±	3.292	10.41
S. L. 9 (2730)	22.62	34.80	31.11	±	2.295	7.38
S. L. 10 (2732)	26.10	36.54	31.32	±	2.677	8.55
S. L. 34 (2733)	24.36	40.02	34.13	±	3.351	9.82
Salvador (996)	15.66 2/	34.80	30.10	±	3.998	13.28
Surinam (990)	26.10	38.28	30.52	±	3.483	11.49
Surinam (2139)	20.88	36.54	31.67	±	3.278	10.35
Tu. 279	24.36	45.24	36.57	±	4.850	13.26
Tu. 302	20.88	38.28	30.28	±	3.671	12.12
Tu. 501	20.88	34.80	31.98	±	2.673	8.36
Typica (Finca)	29.58	40.02	34.45	±	2.306	6.69
Typica var. Local (22)	26.10	36.54	30.59	±	2.411	7.88
Typica hojas pequeñas(11-2)	24.36	43.50	33.65	±	3.646	10.84
Villalobos (2594 - 20)	26.10	36.54	31.56	±	2.223	7.04
6/1 (1999)	29.58	40.02	34.03	±	2.610	7.67
C. canephora						
Robusta L 36 (3579)	19.14	29.58	26.94	±	2.610	9.69
Robusta SA 158 (3581_{2-1})	17.34	29.58	25.72	±	2.286	8.89
Purpurascens (3418_{3-2})	15.66	33.06	26.76	±	3.388	12.93
(3480_{2-1})	19.14	33.06	25.82	±	2.497	9.67

1/ Un grano de 15.66 u, el otro más pequeño es 24.36 µ.
2/ Un solo grano de 15.66, los otros más pequeños empiezan desde 26.10 µ.

Cuadro Nº 1 (Continuación)

	Rango		Promedio de 50 granos	Error estandar s	C.V.
C. eugenioides	26.10	31.32	28.43 ±	1.344	4.73
(3923)	20.88	34.80	28.95 ±	2.650	9.15
(2925)	19.14	33.06	28.74 ±	2.563	8.92
C. liberica					
(3559_{1-2})	20.88	33.06	25.07 ± 1/	2.955	11.78
(3718_{1-1})	19.14	31.32	25.23 ±	3.029	12.01
C. racemosa	20.88	26.10	23.21 ±	1.248	5.38
C. salvatrix	24.36	33.06	29.04 ±	1.672	5.76
Híbridos Intervarietales					
Caturra x Maragogipe (4-2)	26.10	36.54	31.22 ±	2.778	8.90
F2: Acuminata x Padang 975 (HL 1-4)	24.36	36.54	30.52 ±	2.922	9.57
F2: Bourbon Rojo 975 x San Ramón 984 (HL 2-1)	26.10	38.28	31.63 ±	3.199	10.11
F2: Mucronata x Padang 984 (HL 1-2)	24.36	36.54	31.01 ±	2.503	8.07
F2: Mucronata x Padang 975 (HL 1-3)	24.36	36.54	31.95 ±	2.978	9.32
F2: Padang 975 x Bourbon Rojo 995 (HL 3-1)	22.62	41.76	33.13 ±	3.445	10.40
F1: F. 840 2707 x K-7 2737 (Th 173)	24.36	38.28	32.61 ±	3.083	9.45

1/ Promedio de 17 granos.

Cuadro Nº 1 (Continuación)

	Rango		Promedio de 50 granos	Error estandar s	C.V.
F1: H. 66 2731 x Mundo Novo (Th 178)	22.62	36.54	29.65 ±	3.315	11.18
Laurina x Maragogipe (2311)	22.62	33.06	29.13 ±	2.530	8.69
Híbridos Interespecíficos					
F1: Caturra Rojo x Canephora 2770 (Th 153)	20.88	33.06	24.74 ±	2.684	10.85
F1: Villalobos 2594 x Canephora 2770 (Th 161)	27.84	40.02	32.26 ±	2.386	7.40
H1: Villalobos 2594 x Quillou (147)	10.44	36.54	27.73 1/ ±	5.636	20.32
H2: Villalobos 2594 x Quillou (147)	10.44	38.28	28.57 2/ ±	4.102	14.36
H3: Villalobos 2594 x Quillou (146)	13.92	38.28	28.97 2/ ±	4.512	15.57
H4: Villalobos 2594 x Quillou (146)	10.44	38.28	29.27 3/ ±	5.600	18.18
Villalobos 2594 x Quillou (146)	10.44	31.32	20.83 2/ ±	4.824	20.83
C-387 *C. liberica* x *C. arabica* (2916)	27.84	43.50	33.41 ±	3.851	11.53
C. liberica x *C. arabica* (3485_{2-5})	17.40	36.54	30.62 ±	3.752	12.25
C. liberica x *C. arabica* (3485)	24.36	40.02	29.13 ±	4.499	15.44

1/ Promedio de 108 granos.

2/ Promedio de 100 granos.

3/ Promedio de 114 granos.

Cuadro Nº 1 (Continuación)

	Rango		Promedio de 50 granos	Error estandar s	C.V.
Kawisari (3560_{1-1})	22.62	36.54	27.91 ±	2.811	10.07
Kawisari (3560_{2-2})	20.88	38.28	29.23 ±	3.851	13.17
Kawisari (3560_{2-4})	20.88	38.28	27.60 ±	3.568	12.66
Kawisari (3560_{2-5})	19.14	29.58	25.09 ±	2.632	10.49

			Promedio de 25 granos		
Muestras Hacienda Rosabal					
1. NPK y boro	27.84	41.76	33.96 ±	3.260	9.60
2. NPK	27.84	38.28	32.64 ±	2.528	7.75
3. Testigo	29.58	36.54	33.48 ±	2.088	6.24
4. Poliboro 6%	29.58	38.28	32.99 ±	2.102	6.37
5. Poliboro 9%	31.32	38.28	35.43 ±	2.124	5.99
6. Poliboro 12%	27.84	38.28	32.71 ±	2.795	8.54

provenientes de la Hacienda Rosabal, o sea del experimento en el cual se ensayan diferentes fertilizantes con y sin boro. Se observa una variación muy uniforme, pero en el caso del tratamiento Nº 5 (9% de poliboro) se ve que el promedio es más alto que en los otros, lo mismo que el C.V. más bajo, siendo el tratamiento Nº 1 (NPKB) el de rango más amplio y de error estandar y C.V. también más altos.

CUADRO Nº 1-a

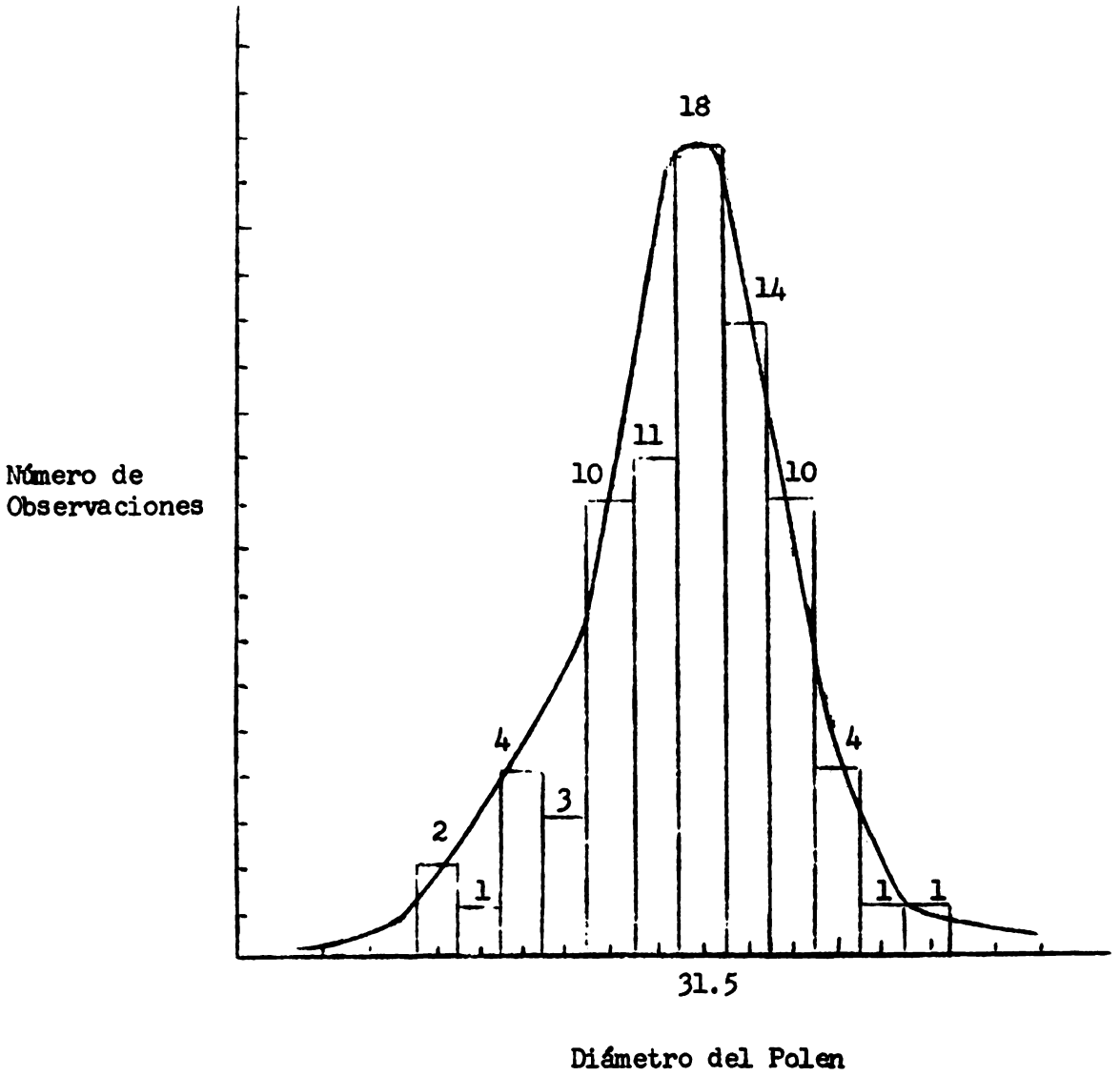
DISTRIBUCION DEL TAMAÑO PROMEDIO DE GRANOS DE POLEN DE C. ARABICA L.

Clases ($\bar{x}$ en micras)	Introducciones
25.00 - 25.99	F. 840 (II - 3364_{1-3}); F. 840 (II - 3364_{2-2})
26.00 - 26.99	Amfillo (2754)
27.00 - 27.99	Angustifolia (9-15); Batie 1 (2250); F. 840 (II - 3364); Mokka (2313)
28.00 - 28.99	Cioiccie (2710); Guadeloupe (971); Jimma 2 (2247)
29.00 - 29.99	Blue Mountain (977); Bourbon Salvadoreño 2 (43); Ceylan Hibrid (982); Etiopia (3524_{2-1}); Guadeloupe (989); Mibirizi (2702); Monosperma; Padang (992); Polysperma (3455); Preanger (981)
30.00 - 30.99	Abasamuele (2255); Agaro (2751); Erecta (2310); Et. Nº 15 (3530); Gudar (2256); Mundo Novo (2544_{3-1}); Padang (975); Salvador (996); Surinam (990); Tu. 302; Typica var. Local (22)
31.00 - 31.99	Angustifolia (9-9); B. A. 14 (2690); Bourbon (Finca); Bourbon Rojo (995); Cera (3427); Erecta-Maragogipe (10-7); Jimma 5 (2253); Kona (979); Local Bronze (2922); Mundo Novo (2544); Mucronata (7-9); S. 333 (3217); S. 333 (3368); S. L. 9 (2730); S. L. 10 (2732); Surinam (2139); Tu. 501; Villalobos (2594-20)

Cuadro Nº 1-a (Continuación)

Clases ($\bar{x}$ en micras)	Introducciones
32.00 - 32.99	Angustifolia (8-2); Arabigo (2138); Erecta-Murta (11-1); Et. Nº 24 (3538); Geisha (2722); H. 1 (2715); Harrar (2918); Le Roy (2140); Murta (2147); Purpurascens (987_{1-1}); Purpurascens (987_{3-2}); San Tamón (984 9-7); Semperflorens (2000); S. 288 (3216)
33.00 - 33.99	Bourbon (9-3); Bourbon Amarillo (2540); Bullata (8-7); Caturra Rojo (2308); Erecta-Typica (10-1); Filipino (972); Geisha (2917); Murta (1992); Pacas (2942); Typica hojas pequeñas (11-2)
34.00 - 34.99	Dessie (2249); S. L. 34 (2733); Typica (Finca); 6/1 (1999)
35.00 - 35.99	Purpurascens (986)
36.00 - 36.99	Tu. 279

La tendencia de las 79 introducciones de C. arabica a agruparse alrededor del promedio puede verse con mayor claridad en el histograma de la página siguiente. Haciendo los cálculos respectivos ($\bar{x} \pm 1.96$ s) se observa que todas ellas se encuentran comprendidas dentro del 95% de probabilidades de pertenecer a una sola población de distribución normal ($31.23 \pm 6.41 = 37.84$ y 24.82 micras).



Histograma que muestra la frecuencia de tamaño promedio de polen en 79 introducciones de C. arabica L.

2. Pruebas de germinación y conservación de polen

Ensayos de germinación utilizando diferentes dosis de sacarosa y agar para determinar la concentración más adecuada para polen de C. arabica L.

Los resultados de las primeras pruebas de tanteo se encuentran resumidos en los Cuadros Nos. 2 y 3. El Cuadro Nº 2 muestra que los porcentajes de germinación más altos corresponden a los medios constituídos por 15% de sacarosa y 0.25% de agar; 10% de sacarosa y 0.166% de agar; y 20% de sacarosa y 0.332% de agar. El porcentaje de germinación más bajo correspondió al medio de 15% de sacarosa y 0.5% de agar.

El análisis de la variancia de este ensayo demuestra que el primer medio de cultivo mencionado es significativo al nivel de 5% sobre los siguientes medios: 30% de sacarosa y 0.5% de agar, 15% de sacarosa y 0.5% de agar, y 25% de sacarosa y 0.833% de agar, pero no hay significancia entre aquél y los otros medios ensayados.

En el sustrato germinativo constituído por 5% de sacarosa y 0.083% de agar se observaron tubos muy pequeños; en cambio, los de 10% de sacarosa y 0.166% de agar, 15% de sacarosa y 0.25% de agar, 5% de sacarosa y 0.166% de agar, y 10% de sacarosa y 0.333% de agar dieron los tubos más grandes de toda la prueba. Sacarosa 20% y agar 0.332%, sacarosa 25% y agar 0.475%, y sacarosa 30% y agar 0.5% mostraron disminución y arrugamiento cada vez más marcado de los tubos. Sacarosa 15% y agar 0.5% dio una germinación muy irregular en cada repetición. A partir de sacarosa 20% y agar 0.66% la longitud de los tubos disminuyó notablemente hasta que en sacarosa 30% y agar 1% la germinación fue nula; también se notaron arrugamientos marcados en los tubos polínicos en los medios constituídos por 20% de sacarosa y 0.666% de agar, y 25% de sacarosa y 0.833% de agar.

CUADRO Nº 2

GERMINACION DE POLEN DE C. ARABICA L.

PRIMERA PRUEBA DE TANTEO UTILIZANDO 6 NIVELES DE SACAROSA

Y DOSIS MINIMAS DE AGAR

Nº de Orden	Medio de crecimiento	% de Germinación ($\bar{x}$ 5 repet.)1/
1	Sacarosa 5% y agar 0.083%	76.78
2	Sacarosa 10% y agar 0.166%	84.18
3	Sacarosa 15% y agar 0.250%	86.06 *
4	Sacarosa 20% y agar 0.332%	83.31
5	Sacarosa 25% y agar 0.475%	79.52
6	Sacarosa 30% y agar 0.500%	57.94
7	Sacarosa 5% y agar 0.166%	71.78
8	Sacarosa 10% y agar 0.333%	73.60
9	Sacarosa 15% y agar 0.500%	41.19
10	Sacarosa 20% y agar 0.666%	75.00
11	Sacarosa 25% y agar 0.833%	54.75
12	Sacarosa 30% y agar 1.000%	--

1/ Se contaron alrededor de 100 granos por repetición. Período germinativo 4 horas.

* Significativo al 5% sobre 6, 9 y 11, pero no con respecto a los otros.

En el Cuadro Nº 3 se observa que las mejores germinaciones pertenecen a las concentraciones 10% de sacarosa y 1% de agar; 30% de sacarosa y 2% de agar, y la más baja a 20% de sacarosa y 1.5% de agar. Este último resultado pudo deberse a que al disminuir el grosor de la

capa del medio germinativo, cortándola con un estilete, éste pudo estar contaminado con una sustancia dañina para el polen, ya que en las primeras repeticiones casi no se observó germinación.

El análisis de la variancia de los resultados del Cuadro Nº 3 se efectuó en forma separada, de acuerdo a la concentración de agar; en este cuadro se han resumido los porcentajes de germinación obtenidos en 4 ensayos (columnas), cada uno de los cuales estuvo constituído por una dosis de agar, variando únicamente las dosis de sacarosa de 5 a 30%. Los resultados demuestran que en 0.5% de agar, la concentración de 15% de sacarosa da diferencias altamente significativas (1%) sobre 30%, pero no sobre las otras dosis aún al 5% de probabilidades. En 1% de agar no hay diferencias estadísticamente aceptables entre las diferentes concentraciones de sacarosa. En 1.5% de agar, 15% de sacarosa fue altamente significativa (al 1%), sobre 5, 20 y 30% de sacarosa pero no sobre 10 ni 25%. En 2% de agar, 30% de sacarosa fue altamente significativa (al 1%) sobre 5, 10 y 15%, pero no sobre 20 ni 25% de sacarosa.

Si se considera únicamente la elongación de los tubos se concluye que las dosis de 10 y 15% de sacarosa muestran los tubos más largos y mejor constituídos. La sacarosa a niveles de 5% mostró tubos más pequeños, y a partir de 20% también se observa un decrecimiento en los mismos y empiezan a notarse algo arrugados, características que se acentúan a 25% y más aún a 30% (ver figuras de la Lámina IV). Sin embargo, cabe anotar que a 20% de sacarosa y 2% de agar se notaron tubos bien desarrollados, pero teniendo en cuenta que 11 horas de germinación es un período casi 3 veces el de los otros se puede descartar esta concentración.

Con base en las experiencias anteriores, se realizaron 2 ensayos definitivos para determinar la concentración de agar y sacarosa más adecuada para la germinación del polen de C. arabica L., eligiendo las 2

CUADRO Nº 3

GERMINACION DE POLEN DE C. ARABICA L.

SEGUNDA PRUEBA DE TANTEO UTILIZANDO 4 NIVELES DE AGAR Y 6 DE SACAROSA. PROMEDIO DE 5 REPETICIONES.[1/] 4 HORAS DE GERMINACION

% de Sacarosa	% de Agar			
	0.5	1.0	1.5	2.0[2/]
5	51.90	73.52	47.89	53.14
10	51.28	74.51	69.19	47.75
15	65.21 **	65.06	72.40 **	55.69
20	43.28	56.91	24.15[3/]	69.41
25	54.89	73.62	70.41	65.65 **
30	11.11	51.35	53.47	74.64

1/ En cada repetición se consideraron alrededor de 100 granos.

2/ 11 Horas de germinación.

3/ Se cometieron errores de técnica, explicación en el texto.

** Dosis de sacarosa significativa al 1% dentro de su respectiva concentración de agar. Cada columna corresponde a un ensayo independiente.

concentraciones de sacarosa de 10 y 15% que demostraron ser las más efectivas, y variando en ellas la concentración de agar: 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%.

En estos experimentos se consideraron los porcentajes de germinación y la longitud de los tubos y se controló además la variación que pudiera interferir en los resultados al tomar indistintamente polen de diversas flores. Por esta razón se seleccionaron siempre las 2 mejores flores de una cima, cuyo polen sirvió para hacer el sembrío en cada uno

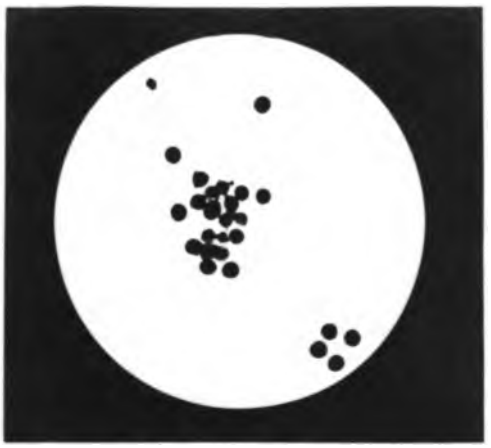


Figura Nª 1. Sacarosa 5%

Figura Nª 2. Sacarosa 10%

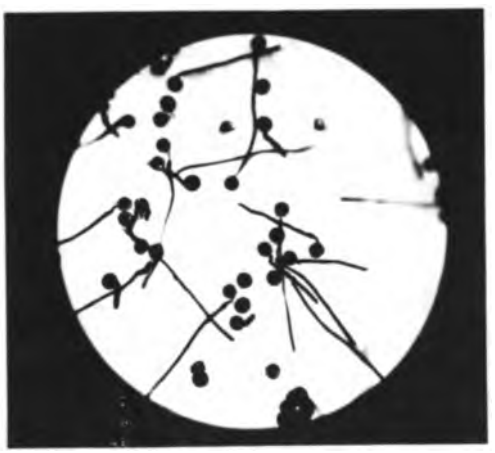


Figura Nª 3. Sacarosa 15%

Figura Nª 4. Sacarosa 20%

Figura Nª 5. Sacarosa 25%

Figura Nª 6. Sacarosa 30%

LAMINA IV. Agar 0.5% y diferentes dosis de sacarosa

de los tratamientos de cada repetición, mediante la técnica descrita anteriormente.

Los resultados de estos 2 experimentos se encuentran resumidos en los Cuadros Nos. 4 y 5. En ambos cuadros la primera columna corresponde a las concentraciones de agar ensayadas, la segunda a los promedios de germinación provenientes de 5 repeticiones y la tercera al promedio de la longitud de los tubos, también de 5 repeticiones, las cuales a su vez constituyen el promedio de 25 tubos medidos al azar en cada repetición. Copias del análisis de la variancia de estos 2 ensayos así como de los otros experimentos realizados en este estudio, quedan archivados en el Departamento de Fitotecnia.

El Cuadro Nº 4 muestra que con 10% de sacarosa el porcentaje más alto de germinación se obtuvo con 1% de agar, y el más bajo con 2%, pero estos resultados estadísticamente no fueron significativos a 5% sino a 32%; por lo tanto, se puede descartar la posibilidad de que las diferencias encontradas se deban al azar. En cambio, en las longitudes de tubos el tamaño más grande se obtiene con 0.2% de agar, y el más bajo en ausencia de éste, encontrándose diferencias a 5%; teniendo en este caso una diferencia límite de significación (DLS) de 76.68 podemos decir que 0.2% de agar es superior a 0, 1.5 y 2%. En cambio se observa también que la longitud de esta misma concentración es más alta que 0.5 y 1% de agar, pero esta superioridad no alcanza significancia al 5% de probabilidades.

El Cuadro Nº 5 muestra que con 15% de sacarosa el porcentaje más alto de germinación corresponde a 0.2% y el más bajo a 0% de agar, sin haber diferencias estadísticamente aceptables ya que hay significancia a 16%. La longitud mayor de los tubos se encuentra en 1% de agar y la

CUADRO Nº 4

GERMINACION Y LONGITUD DE TUBOS POLINICOS DE C. ARABICA L.

EN 10% DE SACAROSA Y DOSIS VARIABLES DE AGAR.

PROMEDIO DE 5 REPETICIONES. 4 HORAS DE GERMINACION

Concentración de agar	% de Germinación	Longitud de tubos polínicos en micras
0%	59.89	249.0
0.2%	65.37	452.0 *
0.5%	64.00	377.8 *
1.0%	68.85	400.8 *
1.5%	55.46	361.6
2.0%	57.07	324.2

$DLS_{0.05}$ para tubos: 76.68.

* Significativos al 5% de probabilidades.

más baja en ausencia del mismo, habiendo diferencias altamente significativas al 1% entre las diversas dosis. Comparando estos promedios mediante la DLS: 54.50 se ve que no hay diferencia significativa entre las concentraciones 1, 0.2 y 0.5% de agar, pero éstos son estadísticamente superiores a 0, 1.5 y 2%, a excepción de 0.5% que no es superior a 1.5%.

Estos resultados anteriores demuestran que se pueden considerar como los medios más adecuados para la germinación y crecimiento del tubo polínico del polen de C. arabica L. las concentraciones siguientes:

Sacarosa	Agar
10%	0.2, 0.5 y 1.0%
15%	0.2, 0.5 y 1.0%

CUADRO Nº 5

GERMINACION Y LONGITUD DE TUBOS POLINICOS EN C. ARABICA L.

EN 15% DE SACAROSA Y DOSIS VARIABLES DE AGAR.

PROMEDIOS DE 5 REPETICIONES. 4 HORAS DE GERMINACION

Concentración de agar	% de Germinación	Longitud de tubos polínicos en micras
0%	63.66	244.2
0.2%	74.85	318.2 *
0.5%	72.50	301.6 *
1.0%	69.36	331.6 *
1.5%	65.66	252.4
2.0%	69.30	245.6

$DLS_{0.05}$ para tubos: 54.5.

* Significativos al 5% de probabilidades.

Teniendo en cuenta que las mejores longitudes de tubos se consiguen con 10% de sacarosa (ver Cuadros Nos. 4 y 5) y que entre las dosis de agar ya mencionadas la longitud más alta corresponde a 0.2% de agar, se adoptó como medio básico de cultivo 10% de sacarosa y 0.2% de agar, concentración que sirvió como control en los experimentos posteriores que se realizaron para estudiar el efecto de diferentes dosis de ácido bórico, ácido giberélico, ácido naftaleno acético y la presencia de estigmas y anteras en el medio germinativo, en la germinación y crecimiento de tubos polínicos a excepción del primer ensayo con ácido bórico.

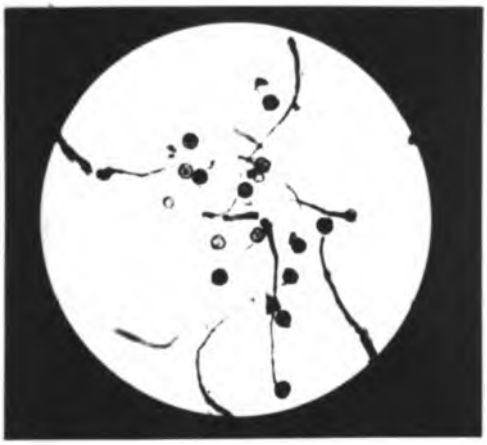


Figura Nº 1. Agar 0.2%

Figura Nº 2. Agar 0.5%

Figura Nº 3. Agar 1.0%

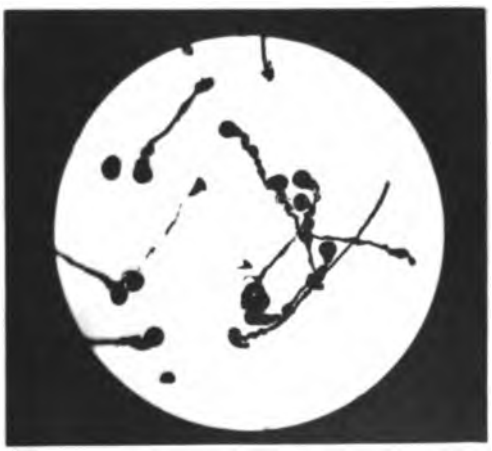


Figura Nº 4. Agar 1.5%

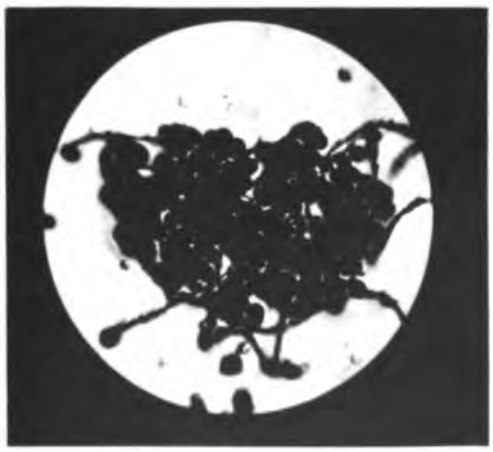


Figura Nº 5. Agar 2.0%

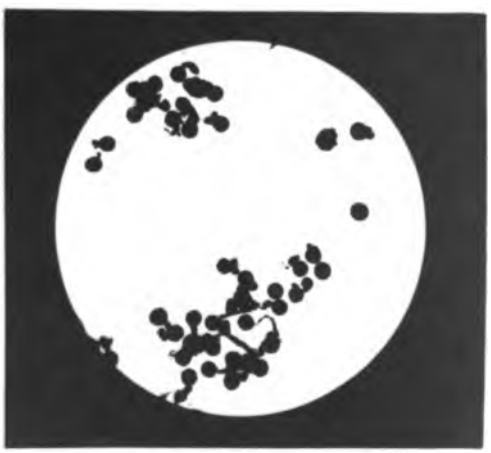


Figura Nº 6. Agar 3.0%

LAMINA V. Sacarosa 15% y diferenres dosis de agar

Ensayos con ácido bórico

Los resultados del primer y segundo ensayo con ácido bórico se encuentran ordenados en los Cuadros Nos. 6 y 7. El Cuadro Nº 8 muestra, la longitud de los tubos obtenida con polen proveniente de la Hacienda Rosabal (pruebas de fertilizantes con y sin la adición de boro).

En el primer experimento con boro el período de germinación fue de 4 horas, utilizando como solución basal 15% de sacarosa y 0.2% de agar. En el segundo ensayo el período germinativo fue de 3 horas; en cambio en las muestras provenientes de la Hacienda Rosabal se empleó como medio de cultivo 0.5% de agar y 10% de sacarosa, pues cuando se realizó este experimento no se había determinado aún la dosis más adecuada; el período germinativo fue de 24 horas y se pusieron a germinar después de 27 horas de haber sido colectadas dichas muestras. También en este mismo experimento se tomaron muestras de las partes superior e inferior de la planta, cuyos resultados fueron analizados separadamente, estableciéndose después comparaciones entre ambos resultados.

Observando en detalle estos cuadros, se ve que en el Nº 6 el porcentaje de germinación más alto se logró con 200 ppm de ácido bórico y el más bajo con 100 ppm. El análisis de la variancia muestra que no hay diferencia estadística a 5% sino a 22% o sea que hay una probabilidad demasiado baja para establecer diferencias seguras entre tratamientos. En cambio en la longitud de tubos se nota la influencia del B a 50 ppm, el cual llega a dar tubos más grandes que el control y que los otros tratamientos. Además se observó que a partir de 100 ppm el ácido bórico empieza a tener un efecto deletéreo, pues se nota un arrugamiento notable que se acentúa mucho a 200 ppm (ver Lámina VI). El análisis de la variancia muestra la amplia superioridad del tratamiento con

50 ppm, ya que la DLS 51.30 es inferior a 111.8, que es la diferencia que hay entre los promedios obtenidos con esta dosis y el control.

En vista de estos resultados se realizó el segundo experimento con ácido bórico, empleando dosis más bajas como se ve en el Cuadro Nº 7. El análisis de la variancia del porcentaje de germinación indica que hay superioridad al nivel de 5% entre tratamientos; comparando las diferencias entre promedios por la DLS se observa que la concentración de 50 ppm de boro es más ventajosa que en los otros tratamientos en la germinación, y entre los otros tratamientos no hay diferencia. Sin embargo, en la longitud de los tubos a pesar de haber algunas diferencias visibles, éstas solamente alcanzan significancia al 19% de probabilidades.

CUADRO Nº 6

EFECTO DEL ACIDO BORICO EN LA GERMINACION Y LONGITUD DE TUBOS POLINICOS DE C. ARABICA L. PRIMER ENSAYO. 5 REPETICIONES. 4 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	% de Germinación	Longitud de tubos polínicos en micras
Solución basal 1/ (control)	59.16	273.8
Solución basal y 50 ppm de BO_3H_3	61.70	385.6 *
Solución basal y 100 ppm de BO_3H_3	52.24	133.8
Solución basal y 150 ppm de BO_3H_3	61.07	83.2
Solución basal y 200 ppm de BO_3H_3	68.53	95.6

1/ Medio germinativo: 15% de sacarosa y 0.2% de agar.

$DLS_{0.05}$ para tubos: 51.30.

* Significativo al 5% de probabilidades.

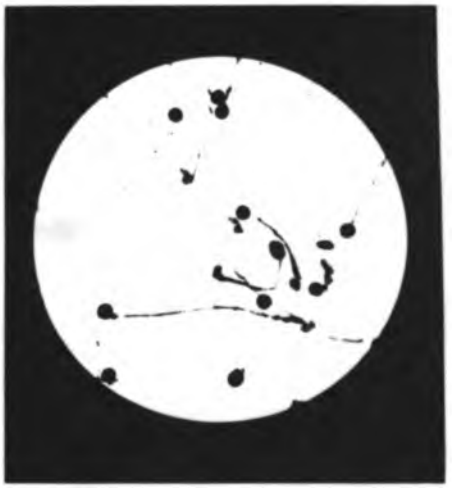


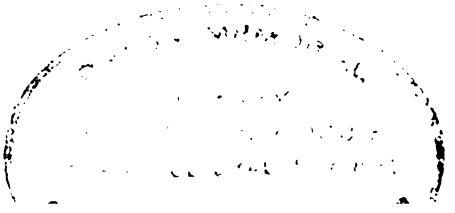
Figura Nª 1. Control

Figura Nª 2. 50 ppm de BO_3H_3

Figura Nª 3. 100 ppm de BO_3H_3

Figura Nª 4. 150 ppm de BO_3H_3

LAMINA VI Efecto del ácido bórico a altas concentraciones



CUADRO Nº 7

EFECTO DEL ACIDO BORICO EN LA GERMINACION Y LONGITUD DE TUBOS POLINICOS DE C. ARABICA L. SEGUNDO ENSAYO. 5 REPETICIONES. 3 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	% de Germinación	Longitud de tubos polínicos en micras
Solución basal 1/ (control)	53.06	305.0
Solución basal y 10 ppm de BO_3H_3	54.43	320.2
Solución basal y 20 ppm de BO_3H_3	50.53	259.4
Solución basal y 30 ppm de BO_3H_3	55.58	272.8
Solución basal y 40 ppm de BO_3H_3	53.75	273.2
Solución basal y 50 ppm de BO_3H_3	61.60 *	340.6

1/ Medio germinativo: 10% de sacarosa y 0.2% de agar.

* Significativo al 5% de probabilidades.

El Cuadro Nº 8 muestra las diferencias en la longitud de los tubos en flores tomadas de las partes superior e inferior de la planta. Se pueden apreciar diferencias notables comparando cada tratamiento independientemente, en ambas partes de la planta. Analizando la diferencia entre tratamientos en la parte alta se ve que no son significativos, pero sí hay diferencia significativa al 5% entre tratamientos en la parte baja. El tratamiento Nº 4 da un promedio de longitud de 251 micras, el cual es superior al resto de los promedios sin que hayan diferencias significativas a este mismo nivel (5%) entre los otros tratamientos. Comparando las diferencias encontradas entre ambas partes de la planta se ve que hay una diferencia altamente significativa al nivel de 1%

entre los promedios de los tratamientos de la parte baja y alta, siendo más notoria esta diferencia en el caso del tratamiento Nº 4 y casi nula en el caso del tratamiento Nº 5.

CUADRO Nº 8

EFECTO DEL ACIDO BORICO COMO FERTILIZANTE EN LA LONGITUD DE LOS TUBOS POLINICOS. MUESTRAS TOMADAS EN EL CAMPO EXPERIMENTAL EN EL CUAL SE ENSAYAN EFECTOS DE FERTILIZANTES CON Y SIN BORO. 24 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	Longitud de tubos en micras ($\bar{x}$ 4 repet.)		Diferencia 1/
	Parte alta	Parte baja	
1. NPK y boro	101.00	198.75	97.75
2. NPK	124.25	147.00	22.75
3. Testigo	148.00	157.00	9.00
4. Poliboro 6%	118.75	251.00 *	132.25
5. Poliboro 9%	145.75	150.00	4.25
6. Poliboro 12%	119.75	182.75	63.00

Medio germinativo: 10% de sacarosa y 0.5% de agar.

$DLS_{0.05}$ para tubos de la parte baja: 69.66.

1/ Estas diferencias son altamente significativas al 1%.

* Significativo al 5% de probabilidades.

Ensayo con ácido giberélico

Los resultados obtenidos con las dosis de ácido giberélico se hallan en forma resumida en el Cuadro Nº 9. El análisis de la variancia del porcentaje de germinación demuestra diferencia significativa al 5% entre las dosis, siendo 500 ppm superior a todos los tratamientos, pero no hay superioridad estadísticamente comprobada al nivel de 5% entre los tratamientos restantes, a pesar de que el testigo muestra un porcentaje de germinación más alto. En cambio analizando los resultados que corresponden a la longitud de tubos se ve que el testigo es superior a todas las dosis de ácido giberélico utilizadas. Se puede decir por lo tanto que el efecto de esta sustancia afecta desfavorablemente al polen, dando en el caso de 500 ppm los tubos más cortos de todo el ensayo hecho en este proyecto.

Comparando las diferentes concentraciones de ácido giberélico ensayadas utilizando la DLS: 102.87, parece que las dos primeras dosis y aún la tercera causan un efecto deletéreo más o menos uniforme, pero a partir de 250 ppm ya empiezan a ser letales para el desarrollo normal del tubo. Sin embargo, es muy interesante el hecho de que 500 ppm dé un porcentaje de germinación, estadísticamente comprobado, superior al de las otras dosis y a la vez ser una concentración en la cual se inhibe más el crecimiento de los tubos polínicos.

Ensayo con ácido naftaleno acético (ANA)

Los resultados obtenidos utilizando 6 dosis de ANA se hallan resumidos en el Cuadro Nº 10, en el cual se indican solamente los porcentajes de germinación, considerándose como germinados en este caso los granos que presentaban un pequeño mamelón. En la determinación del porcentaje de germinación del control, en cambio, se contaron como germinados

CUADRO Nº 9

EFECTO DEL ACIDO GIBERELICO EN LA GERMINACION Y LONGITUD DE TUBOS POLINICOS DE C. ARABICA L. (PROMEDIO DE 5 REPETICIONES).

3 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	% de Germinación	Longitud de los tubos polínicos en micras
Solución basal 1/ (control)	57.74	328.8 *
Solución basal y 31.25 ppm de AG	48.77	298.8
Solución basal y 62.50 ppm de AG	52.25	273.2
Solución basal y 125 ppm de AG	54.53	253.6
Solución basal y 250 ppm de AG	57.21	168.8
Solución basal y 500 ppm de AG	67.70 *	95.0

1/ Medio germinativo: 10% de sacarosa y 0.2% de agar.

* Significativo al 5%.

$DLS_{0.05}$ para tubos: 102.87.

todos aquellos granos que presentaban una longitud 3 veces mayor al diámetro del polen. En general se puede decir que esta sustancia es completamente deletérea, puesto que en todas las concentraciones probadas tuvo un efecto inhibidor en ambos procesos, germinación y crecimiento del tubo polínico. El análisis de la variancia se hizo considerando solamente los tratamientos que llevaron ANA, eliminando el control que fue completamente superior a todos, y no encontrando ninguna diferencia entre tratamientos.

CUADRO Nº 10

EFECTO DEL ACIDO NAFTALENO ACETICO EN LA GERMINACION DE POLEN DE C. ARABICA L. ($\bar{x}$ DE 5 REPETICIONES). 4 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	% de Germinación
Solución basal[1/] (control)	64.62
Solución basal y 25 ppm de ANA	19.38
Solución basal y 50 ppm de ANA	28.03
Solución basal y 100 ppm de ANA	27.90
Solución basal y 200 ppm de ANA	24.84
Solución basal y 300 ppm de ANA	23.48
Solución basal y 400 ppm de ANA	21.94

1/ Medio germinativo: 10% de sacarosa y 0.2% de agar.

Ensayos con estigmas macerados y anteras, y media antera

Estos resultados se hallan resumidos en los Cuadros Nos. 11 y 12. Haciendo el análisis de la variancia del porcentaje de germinación en el caso del Cuadro Nº 11 no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos y el control, pero sí entre bloques al 5%. En la longitud de tubos sí existen diferencias altamente significativas al 1% entre tratamientos; utilizando para fines comparativos la DLS 90.78 vemos que el control es muy superior a los 2 tratamientos con estigmas macerados y anteras pero no hay diferencias entre estos tratamientos. Esto demuestra que los estigmas añadidos al medio de cultivo en lugar de favorecer el crecimiento de los tubos polínicos lo inhiben, y además no se observó ningún efecto de quimiotropismo de los tubos

CUADRO Nº 11

EFECTO DE ESTIGMAS MACERADOS Y ANTERAS EN LA GERMINACION Y LONGITUD DE LOS TUBOS DE POLEN EN C. ARABICA L. ($\bar{x}$ DE 5 REPETICIONES). 4 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	% de Germinación	Longitud de los tubos polínicos
Solución basal 1/ (control)	68.47	398.0 **
Solución basal y estigmas macerados	69.02	253.0
Solución basal y anteras	68.47	255.8

1/ Medio de cultivo: sacarosa 10% y agar 0.2%.

** Significativo al 1% de probabilidades.

CUADRO Nº 12

EFECTO DE LAS ANTERAS EN LA GERMINACION Y LONGITUD DE LOS TUBOS DE POLEN EN C. ARABICA L. ($\bar{x}$ DE 8 REPET.). 5 HORAS DE GERMINACION

Tratamientos	% de Germinación	Longitud de los tubos polínicos
Solución basal 1/ (control)	60.14	481.62 **
Solución basal y medias anteras	58.52	313.75

1/ Medio de cultivo: sacarosa 10% y agar 0.2%.

** Significativo al 1% de probabilidades.

hacia el estigma macerado. Lo mismo se puede decir con respecto a las anteras, las cuales demostraron en forma más intensa su efecto inhibitorio sobre los tubos que crecían más cerca de ellas.

Para conocer mejor el efecto inhibidor de las anteras en el crecimiento del tubo polínico se realizó otro ensayo comparativo utilizando solamente media antera en el sustrato germinativo, cuyos resultados se compararon en 8 repeticiones con los del medio de cultivo simple (10% de sacarosa y 0.2% de agar). El análisis de la variancia demuestra de nuevo lo observado anteriormente (ver Cuadro Nº 12), es decir las anteras añadidas al medio no inhiben la germinación pero sí el desarrollo de los tubos polínicos, ya que las longitudes alcanzadas en el control son altamente significativas al 1% con respecto al tratamiento con media antera.

Conservación del polen de cafeto

Los resultados de estos ensayos se encuentran ordenados en el Cuadro Nº 13 y se observan con más claridad en el Gráfico Nº 1 y Nº 2 para el caso del polen del cultivar 'Typica' y en el Gráfico Nº 3 y Nº 4 para el cultivar 'Bourbon'. En estas determinaciones se dio más importancia al polen de 'Typica' que constituía el principal objetivo de este proyecto; por esta razón los porcentajes de germinación y longitud de tubos se determinaron en 4 portaobjetos para cada tratamiento (sustancia desecante). En cambio para 'Bourbon' solamente se hicieron pruebas para cada tratamiento utilizando 2 portaobjetos.

Observando el gráfico correspondiente al cultivar 'Typica' se ve que paulatinamente el polen va perdiendo su viabilidad lo que se demuestra por la pérdida tanto de la germinación como por la disminución del crecimiento de los tubos. A pesar de que a los 10 días de conservación

el polen mantenido en desecador con cloruro de calcio muestra un mayor porcentaje de germinación y tubos más largos que en el caso de sílica gel, tiene una caída brusca en la germinación a los 20 días; en cambio, con sílica gel logra mantenerse un poco mejor. A partir de este momento como puede verse en el Gráfico Nº 1 la disminución de la germinación en ambos desecadores se efectúa en forma paralela, pero siempre la sílica gel demuestra su superioridad con respecto al cloruro de calcio.

El óxido de calcio en cambio parece ser el medio menos efectivo en la conservación del polen de café arábico, pues a los 10 días de conservación da un porcentaje de germinación muy bajo (10.14%) y los tubos no alcanzan una longitud de 3 veces el diámetro del grano. A los 20 días la germinación es nula y a pesar de que el desecador tenía la misma cantidad de óxido de calcio que el de los otros desecadores los depósitos con polen estaban llenos de hongos, los cuales seguramente producirían fermentaciones que mataron al polen en poco tiempo.

La conservación de polen en las anteras resultó también ser inefectiva para este propósito, como se puede observar por los datos mostrados en el Cuadro Nº 13.

Si se observan los resultados obtenidos con polen de 'Bourbon' en el mismo cuadro se ve que a los 10 días el porcentaje de germinación es menor que en 'Typica', y desde esa fecha muestra una disminución paulatina hasta el final del período de conservación, casi en la misma forma que en el caso del cultivar 'Typica'. Estos resultados se ven con mayor claridad en el Gráfico Nº 3. Sin embargo estos datos no podrían compararse con los de 'Typica' porque ellos provienen solamente de 2 portaobjetos.

Lo mismo que se observó para el cultivar 'Typica' se podría decir con respecto a la conservación del polen en anteras en el cultivar 'Bourbon'.

CUADRO Nº 13

EFECTO DE SUSTANCIAS DESECANTES EN LA CONSERVACION DE POLEN EN 'TYPICA' Y 'BOURBON'

Forma de conservación	Forma de conservación	Cultivar: 'Typica'[1] — Sustancia desecante: Sílica gel — % Germ.	'Typica' — Sílica gel — Long. tubos en micras	'Typica' — Cl_2Ca — % Germ.	'Typica' — Cl_2Ca — Long. tubos en micras	'Typica' — CaO — % Germ.	'Typica' — CaO — Long. tubos en micras	'Bourbon'[2] — Sílica gel — % Germ.	'Bourbon' — Sílica gel — Long. tubos en micras	'Bourbon' — Cl_2Ca — % Germ.	'Bourbon' — Cl_2Ca — Long. tubos en micras	'Bourbon' — CaO — % Germ.	'Bourbon' — CaO — Long. tubos en micras
Polen solo	10	62.83	481	64.16	552	10.14[3]	-	44.04	412	50.95	510	-	-
	20	54.61	418	39.86	392	-	-	38.20	260	47.00	221	-	-
	30	51.11	393	37.87	258	-	-	21.56	119	12.50	132	-	-
	40	42.14	324	29.13	201	-	-	16.38	114	9.13	103	-	-
	50	25.64	245	15.25	135	-	-	11.34	109	6.92	91	-	-
	60	13.72	135	6.00	83	-	-	10.07	63	6.37	71	-	-
	70	8.97	104	5.81	82	-	-	7.32	56	6.00	64	-	-
	80	5.24	88	4.75	78	-	-	6.69	56	4.61	59	-	-
En anteras	10	21.41	92	12.00	95	-	-	17.45	104	16.41	112	-	-
	20	8.20	24	7.04	63	-	-	9.12	62	10.31	75	-	-

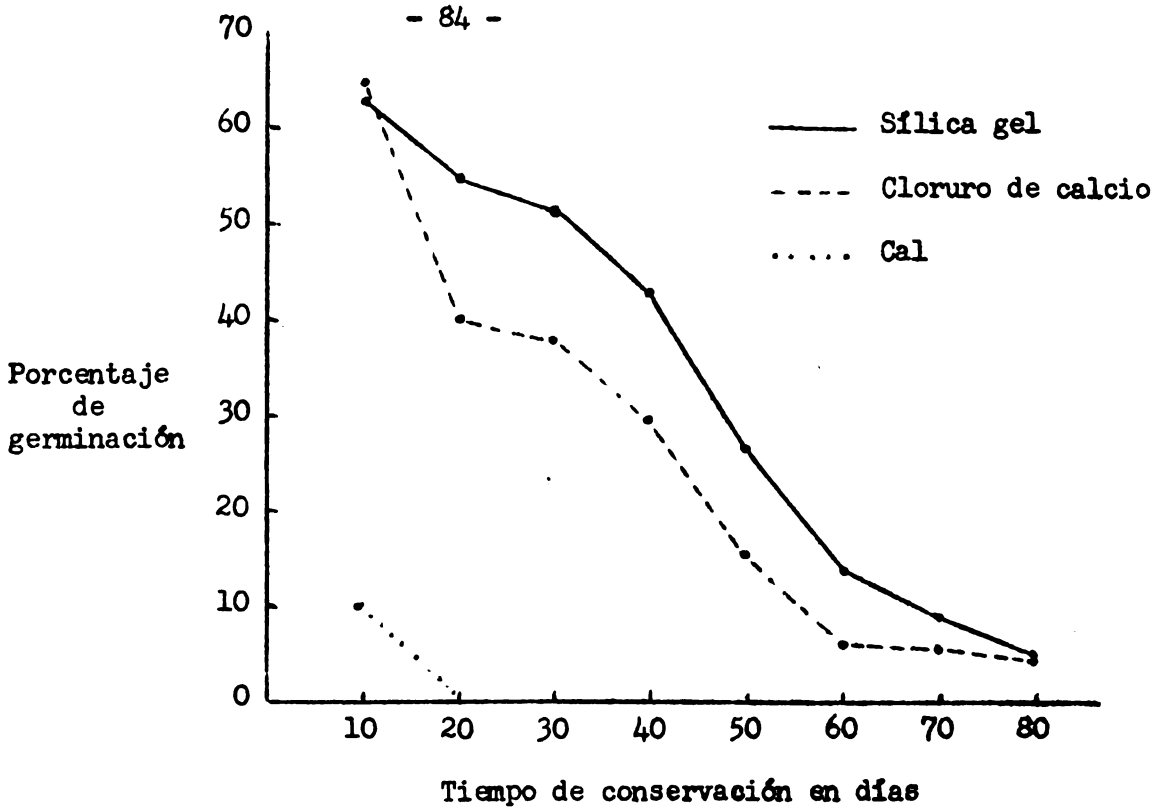


Gráfico Nº 1. Efecto de 3 desecantes en la conservación de polen de 'Typica'.

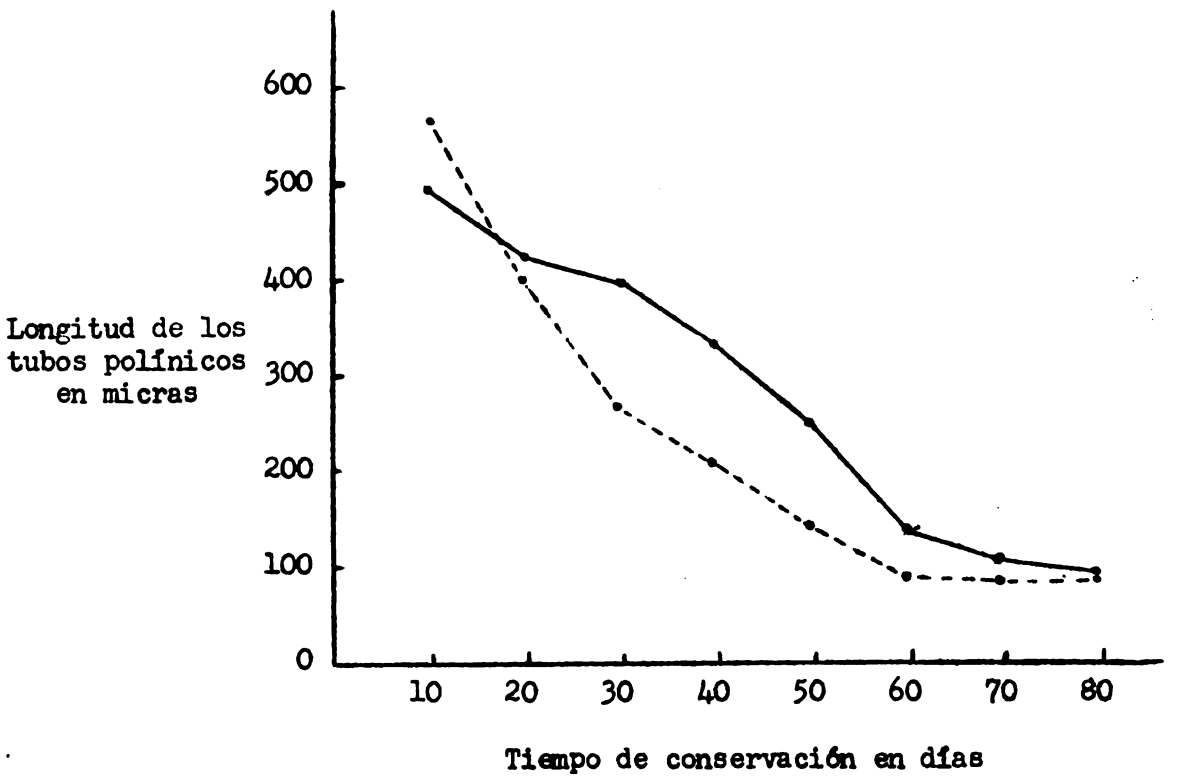


Gráfico Nº 2. Efecto de 2 desecantes en la conservación de polen de 'Typica'.

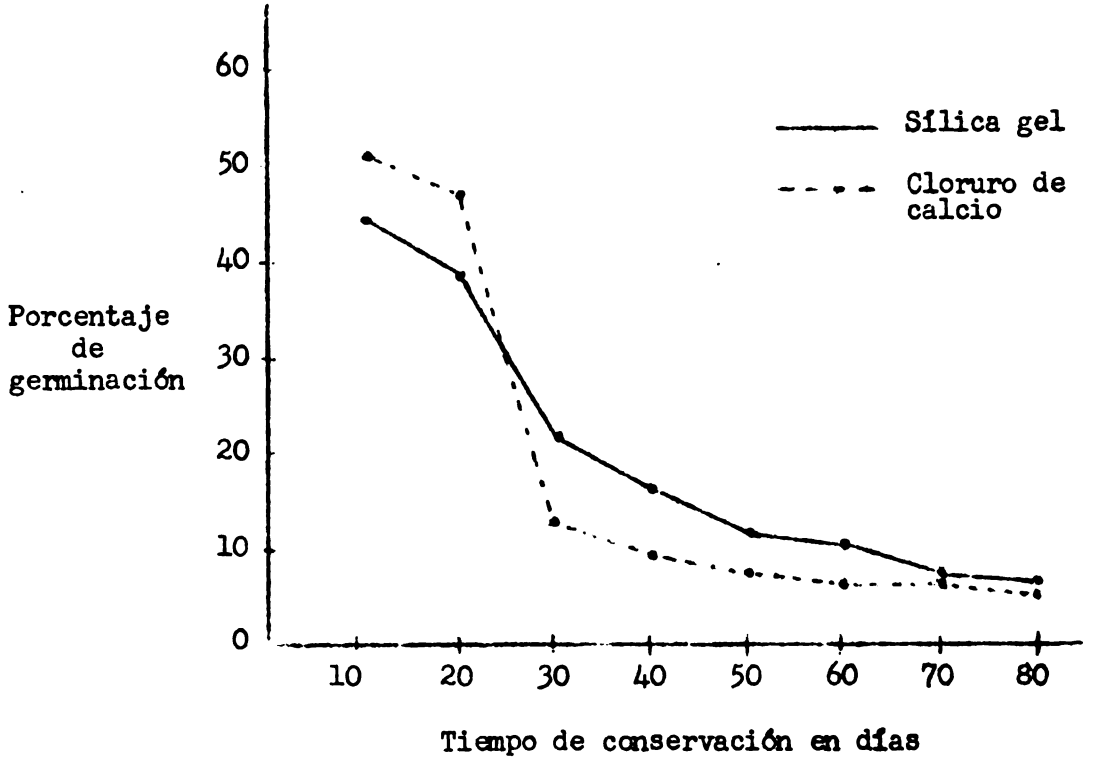


Gráfico Nº 3. Efecto de 2 desecantes en la conservación de polen de 'Bourbon'.

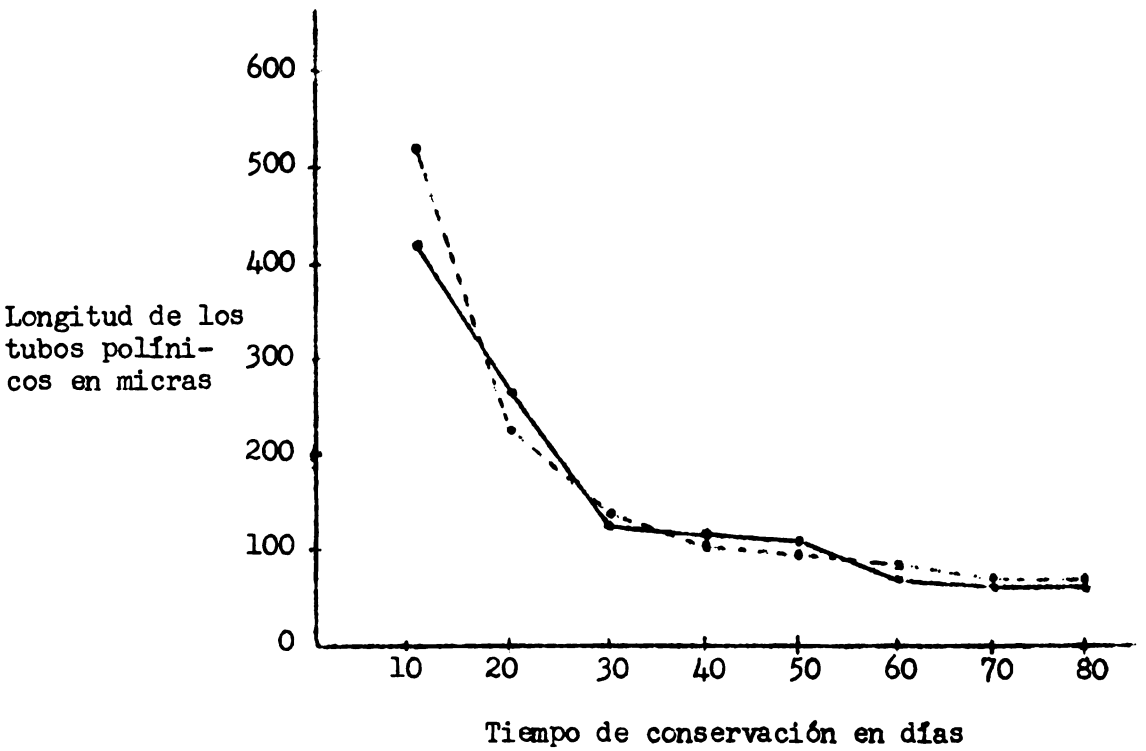


Gráfico Nº 4. Efecto de 2 desecantes en la conservación de polen de 'Bourbon'.

3. Polinizaciones en C. arabica L.

Los resultados del primer experimento se polinización en botones de flores normales se encuentran en el Cuadro Nº 14, en el cual se ve que el mayor porcentaje de fructificación se obtiene cuando las flores son polinizadas al segundo día de la castración, o sea en el día en que normalmente abren las flores.

El número de frutos obtenidos cuando los botones se castraron, protegieron y quedaron sin polinizar es el más bajo. Esto indica que los estigmas son receptibles antes de la apertura de la flor y que también la dehiscencia del polen comienza en la misma época.

El porcentaje relativamente alto de frutos obtenidos de los botones castrados y dejados a libre polinización también nos indica la importancia que tienen los agentes polinizadores (viento, insectos y gravedad).

El análisis de la variancia del número de flores que se utilizaron en cada experimento no dan diferencias significativas entre ellas, de allí que la fructificación obtenida pudo también ser comparada estadísticamente, siendo el tratamiento 3 (botones castrados, cubiertos, polinizados el primer día de la apertura de la flor) superior a los dos primeros (botones castrados, sin cubrir - botones castrados, cubiertos, sin polinizar), al nivel de 5%. El tratamiento 4 (botones castrados, cubiertos, polinizados el primer y segundo día de la apertura de la flor) solamente superior al tratamiento 2 (botones castrados, cubiertos, sin polinizar) y éste a su vez inferior al primero (botones castrados, sin cubrir) al mismo nivel de significancia.

CUADRO Nº 14

EFECTO DE LA POLINIZACION ARTIFICIAL EN LA FERTILIZACION DE FLORES NORMALES

Tratamientos	Nº de botones emasculados	Nº de frutos logrados	% de Fructificación
1. Botones castrados, sin cubrir	224	117	52.23
2. Botones castrados, cubiertos, sin polinizar	225	41	18.22
3. Botones castrados, cubiertos, polinizados el primer día de la apertura de la flor	200	153	76.50
4. Botones castrados, cubiertos, polinizados el primer y segundo día de la apertura de la flor	223	156	69.96

Los resultados del ensayo de polinización en flores semiabiertas se encuentran en el Cuadro Nº 15, en el cual se observa una fructificación mayor en el testigo constituído por flores semiabiertas sin ningún tratamiento. El porcentaje de 12.57 obtenido de flores castradas, cubiertas y sin polinizar demuestra que parte de las flores se polinizan el mismo día de su semiapertura. Como el número de flores en cada repetición varió mucho porque varios estigmas se malograron durante la manipulación se hizo un análisis previo del número de flores por repetición, encontrándose diferencias al 5% de probabilidades, de allí que para fines comparativos en este experimento se tuvo que hacer el análisis de la covariancia el cual muestra la superioridad del testigo al 1% con respecto a los tratamientos. Entre éstos fue superior el tratamiento con flores castradas cubiertas y polinizadas al nivel de 1%.

CUADRO Nº 15

EFECTO DE POLINIZACION ARTIFICIAL EN FLORES SEMIABIERTAS

Tratamientos	Nº de Flores	Nº de Frutos logrados	% de Fructificación
Testigo	174	106	60.92
Flores castradas y cubiertas sin polinizar	175	22	12.57
Flores castradas, cubiertas y polinizadas al tercer día de la castración	140	70	50.00

Los resultados del experimento utilizando polen irradiado a 3 dosis diferentes (400r, 800r y 1600r) se encuentran en el Cuadro Nº 16, en el cual se puede observar que el porcentaje de fructificación logrado en todos los tratamientos es casi uniforme. Aunque se nota una ligera superioridad del tratamiento con 800r el análisis de la variancia nos demuestra que no hay superioridad estadísticamente aceptable entre tratamientos, incluyendo el testigo; existen diferencias a 17%, a pesar de que el porcentaje de fructificación con 1600r fue el más bajo. Esto nos lleva a la conclusión de que las irradiaciones con rayos gamma hasta 1600r no disminuyen la capacidad de fertilización del polen.

Los resultados de cruzamiento real determinados en la semilla, considerando como tales aquéllas de endosperma verde, se encuentran en el Cuadro Nº 17. Estos datos se hallan expresados en porcentajes.

Observando la columna correspondiente a caracolillo se ve que a 400r y 800r este porcentaje es casi similar al control, pero a 1600r se aumenta al doble el número de semillas de este tipo.

CUADRO Nº 16

EFECTO DE POLINIZACION ARTIFICIAL UTILIZANDO POLEN IRRADIADO

Tratamientos	Nº de Botones emasculados	Nº de Frutos obtenidos	% de Fructificación
Testigo	198	125	63.13
400r	199	125	62.81
800r	191	135	70.68
1600r	164	92	56.10

CUADRO Nº 17

CRUZAMIENTO REAL Y CARACTERISTICAS DE LA SEMILLA OBTENIDA CON POLEN IRRADIADO, EXPRESADOS EN PORCENTAJE

	Tipo de endosperma			Clase de semilla		
Tratamientos	Verde %	Amarillo %	Dudosas %	Normales %	Caracolillo %	Anormales %
Testigo	99.44	-	0.56	93.28	5.60	1.12
400r	97.13	0.48	2.39	94.26	5.26	0.48
800r	96.48	2.20	1.32	93.39	6.61	-
1600r	97.16	1.42	1.42	87.23	12.77	-

DISCUSION

El tamaño de los granos de polen de las diversas introducciones pertenecientes al C. arabica L. estudiadas en el presente trabajo, muestran en la mayoría de ellas rangos más o menos uniformes, aunque en algunos casos se observó una variación muy notable. Tales variaciones no son sorprendentes, puesto que el tamaño del polen no es uniforme dentro de una especie y varía a veces dentro de límites estrechos de árbol a árbol, flor a flor, antera a antera, dentro de la misma antera y también de floración a floración, y con la época de recolección, tal como lo indican Kuprijanov, Oncinnikov, Harris y Gould (citados por Bell, 4), Dublin (19, 20), Flory y Tomes (29), y Smith (84).

Según Bell (4) la variación del tamaño en polen se puede deber a factores del medio ambiente, nutricionales y a la constitución genética individual en cada planta.

La curva de distribución de los promedios por clases de las 79 introducciones de C. arabica L. muestra la característica normal, con pocos extremos y numerosos tipos centrales.

Considerando independientemente a la variedad 'Typica' como el representante normal de C. arabica L., se ve que el rango de variación es de 29.58 a 40.02 micras, promedio 34.45 micras y un C.V. de 6.69%, datos muy similares a los mencionados por Krug (44), con una variación menor a 7% que según Dublin (19) es satisfactoria en esta clase de trabajos. No obstante, existen introducciones como 'Cioccie' que muestra un C.V. de 21.97%, variación que no se encontró ni en los híbridos interespecíficos estudiados, lo que hace suponer la naturaleza híbrida de tal introducción. La variedad 'Monosperma' tiene también una variabilidad amplia, C.V. 18.83%, el cual comparado con el encontrado por Mendes y

Bacchi (58) es relativamente bajo a pesar de que estos autores midieron 200 granos de polen, obteniendo un C.V. de 29.35%. Teniendo en cuenta que la variación disminuye al aumentar el número de observaciones, la variación obtenida es muy baja. La variación alta observada en una de las dos muestras de 'Mundo Novo' puede explicarse con base en los estudios de Mendes, Medina y Conagin Mendes (56), quienes encontraron irregularidades en la distribución de los cromosomas durante el proceso de la microsporogénesis, que según ellos no se encuentra con frecuencia en C. arabica L.

Krug (44) encontró un rango de 28 a 60 y de 24 a 56 micras con un C.V. de 12.6% y 12% para var. 'Bullata' (hexa y octoploide respectivamente); en cambio en la misma variedad aquí estudiada no se encontró un rango tan amplio ni granos gigantescos de 60 y 56 micras como los citados por ese autor, ya que el rango en este caso varió de 24.36 a 38.28 micras pero con un C.V. de 10.38% que es muy parecido al hallado por Krug. Asumiendo que se trata de un poliploide se observa que el rango no se diferencia del de los tetraploides normales, lo cual estaría de acuerdo con lo encontrado por Bell (4) en el sentido de que el tamaño del polen no puede ser utilizado como un indicador de poliploidía, puesto que falla muchas veces, ni puede servir para diferenciar variedades tal como lo sugiere Dublin para C. canephora var. 'Nana'

El promedio general de 31.23 ± 3.27 micras de los 3950 granos medidos en las 79 introducciones de C. arabica nos da una indicación relativa del tamaño del grano de polen de la especie C. arabica, pero no como un carácter absoluto; aunque Medina y Mendes (56) citan la cifra de 36.79 micras como el promedio de tamaño de los granos de polen de C. arabica, estas diferencias pueden deberse a efectos del medio ambiente o de origen nutricional.

Comparando las variaciones de C. arabica con las observadas en las 4 introducciones de C. canephora, vemos que en esta última especie no se encuentran C.V. mayores de 12.93% ni promedios de más de 26.94 micras. Estos resultados no tendrían mucho valor puesto que provienen de un número reducido de muestras, pero permiten establecer que el polen de C. canephora es más pequeño que el de C. arabica, ya que el promedio general es de 26.31 micras, cifra un poco inferior a 29.44 micras citada por Medina y Conagin Mendes (56).

La menor variación en el tamaño de los granos de polen de C. canephora puede explicarse de acuerdo con lo expuesto por Mendes (61), quien observó que la microsporogénesis es normal en esta especie: de 95 microsporocitos observados solamente 2 presentaron anormalidades en el sentido de que 10 cromosomas van a un polo y 12 al otro; expresada en porcentaje dicha meiosis es igual a 93.68. Sin embargo, el mismo Mendes (60) en una publicación anterior anotó que en esta especie hay una gran variabilidad de tamaño, el cual no serviría para identificarla.

Se observa una variación mucho menor en el polen de C. eugenioides, teniendo esta especie como promedio general de las 3 introducciones estudiadas 28.77 micras, tamaño intermediario entre las 2 especies anteriormente citadas y casi similar al de C. salvatrix que fue de 29.04 micras.

Las mediciones de polen de las 2 introducciones de C. liberica muestran una mayor variación que en el C. canephora, C. eugenioides, C. salvatrix y C. racemosa, pero presenta un tamaño promedio mucho más pequeño comparado con las demás especies estudiadas a excepción de la última, en la cual se observó el tamaño más bajo.

Por otra parte, la variación no muy acentuada en los híbridos

intervarietales estudiados permite especular en el sentido de creer que tal vez en C. arabica las llamadas variedades no sean sino líneas con diferencias genéticas no muy notables, que han sido separadas por selección.

En cambio, tal como se esperaba, en la mayoría de los híbridos interespecíficos la variación fue alta, siendo mayor en el polen de 2 plantas del cruce 'Villalobos' 2594 x 'Quillou' (C.V. 20.83 y 20.32%); sin embargo, llama la atención el caso del F_1 de 'Villalobos'2594 x C. Canephora 2770 que dio una variación bajísima, incluso más baja que muchas introducciones de C. arabica. Krug y Mendes (48) encontraron que para el cruzamiento de C. arabica x C. canephora y C. canephora x C. arabica, el tamaño del grano de polen de estos híbridos es extremadamente variable con un C.V. de 24.18% debido a que los procesos meióticos dan un número variable de microsporas desde 4 hasta 9. Es interesante el hecho de que en ningún híbrido interespecífico estudiado, se observaron granos de 48 micras como los encontrados por estos autores, pues el tamaño máximo hallado fue de 43.5 micras perteneciente al cruzamiento C. liberica x C. arabica.

Teniendo en cuenta que el tamaño de los granos de polen es una característica muy variable como lo han demostrado numerosos autores, y que en C. arabica hasta la fecha tan sólo se han efectuado estudios esporádicos en este aspecto, se sugiere una determinación más exacta de dicha característica considerando un número mayor de granos, debido a que en el presente trabajo se obtuvieron datos algunas veces contradictorios. En otras especies de café, en cambio, se han realizado tales estudios en forma más detallada como en C. canephora por Dublin (19), y en C. dewevrei por el mismo Dublin (20) y Medina y Mendes (56).

Las primeras pruebas de germinación de polen de C. arabica (Cuadros Nos. 2 y 3), permiten establecer que las mejores dosis de sacarosa son 10 y 15%, determinaciones que más que todo fueron basadas en el desarrollo y conformación del tubo polínico, y no en los porcentajes de germinación, porque éstos muchas veces son erróneos y muy diferentes (40, 64). Las fotografías de la Lámina IV ilustran más objetivamente lo expuesto con anterioridad.

Considerando que el tubo polínico tiene que recorrer una distancia relativamente grande durante el proceso de la fertilización, se podría decir que tal característica es un índice de viabilidad mucho más práctico porque de nada serviría tener porcentajes de germinación elevados y a la vez tubos mal desarrollados. Por esta razón, en la determinación del medio más adecuado se tomó muy en cuenta esta característica.

Los resultados obtenidos al ensayar 10 y 15% de sacarosa indican que la germinación y crecimiento del tubo polínico son fenómenos no relacionados tal como lo han indicado otros autores (Addicott, 1; Viser, citado por Brewbaker, 6).

Las dosis más efectivas de agar fueron 0.2, 0.5 y 1% y entre éstas fue ligeramente superior 0.2 en el caso de 10% de sacarosa y 1% en la de 15% de sacarosa. Por estos resultados se puede concluir que las concentraciones 10 y 15% de sacarosa, y 0.2, 0.5 y 1% de agar son las mejores para la germinación del polen de C. arabica.

Desde el punto de vista práctico puede considerarse como la más conveniente de estas concentraciones 10% de sacarosa y 0.2% de agar, debido a que en ella se obtienen los tubos más grandes. Es también fácil de preparar por la cantidad relativamente baja de sus constituyentes, lo que permite efectuar tales pruebas en un tiempo más corto evitando la

pérdida de viabilidad del polen por acción del tiempo, y lo que es más importante aprovechar al máximo las cortas floraciones tan peculiares del género Coffea.

En medios de cultivo constituídos por 10% de sacarosa y 0.2% de agar se obtuvo 65.37% de germinación, inferior a 83% logrado por Mendes (60) con dosis de 10% de sacarosa y 0.5% de agar, cifra que no puede compararse con el primero porque dicho autor no especificó el tiempo de germinación empleado ni la forma de determinación de tal porcentaje. En cambio, en el presente trabajo, el período de germinación fue de 4 horas y sólo se contaron como germinados aquellos granos cuyos tubos eran 3 veces mayores que el diámetro del polen. Sin embargo, en las mismas dosis sugeridas por Mendes se obtuvo únicamente 64% de germinación.

Medina (53, 54), después de 24 horas, encontró 69% de germinación en sustratos germinativos de 0.5% de agar y 15% de sacarosa y concluye diciendo que este porcentaje es normal para polen de C. arabica, pero en los ensayos realizados con la misma dosis se obtuvo 72.50% y en la sexta parte del tiempo utilizado por Medina.

El 90% de germinación considerado como normal para C. arabica por Krug (44) y Krug y Mendes (48) es muy dudoso y tal vez carece de valor, ya que dichos autores no especificaron las condiciones de germinación, el medio y el tiempo utilizado. En cambio, en las condiciones expuestas en este trabajo el porcentaje más alto observado fue 74.85% que se logró con 15% de sacarosa y 0.2% de agar. Considerando todos los ensayos realizados el porcentaje más alto que se obtuvo fue 86.06% (en 10% de sacarosa y 0.25% de agar, Cuadro Nº 2); pero si tenemos en cuenta que en ese caso se contaron como germinados los granos con una ligera

protuberancia, podemos considerar como más aceptable 74.85% como el más alto.

Dublin (19) en medios de 10% de sacarosa en agua destilada encontró 330.6 micras como promedio de las longitudes de tubos de C. canephora, después de 4 horas de germinación. En las mismas condiciones se obtuvo para C. arabica un promedio de 249 micras, lo cual estaría en desacuerdo con lo expuesto por Mendes (60), quien indicó que el tubo polínico en C. canephora crece en forma más lenta que en C. arabica. Esta diferencia tal vez se deba a condiciones de germinación, a la edad del polen (83) o a la clase de medio que empleó este autor, muy diferente al de Dublin y al nuestro.

Estudios de germinación de polen en C. dewevrei (Dublin, 20) demuestran que el polen de esta especie puede germinar bien hasta en agua pura (60% de germinación), cifra que es muy similar a la encontrada en C. arabica en concentraciones de 10 y 15% de sacarosa en agua destilada (Cuadros Nos. 4 y 5), en las cuales los tubos fueron muy engrosados y muchos reventaron; esto haría suponer que tal vez la presión osmótica en el polen de C. arabica es mayor que en C. dewevrei y aún que en C. canephora porque Devreux y otros (18) encontraron un porcentaje de germinación muy alto (90%) en soluciones de sacarosa al 1%.

Brink (7) cree que el crecimiento de los tubos polínicos en el medio de cultivo se limita por falta de agua y sustancias de reserva, en cambio in vivo estas condiciones se mantienen en igual proporción, pero esto no explicaría lo encontrado en estos ensayos, puesto que en soluciones simples de sacarosa (10 y 15%) sin adición de agar, el polen de C. arabica tendría la suficiente cantidad de humedad y nutrientes, y sin embargo en estas concentraciones la longitud alcanzada por los tubos

polínicos fue más baja que cuando se agregó agar. Esto hace suponer que el agar tiene un efecto distinto al que generalmente se le asigna, ya que su ausencia o exceso se hace sentir en forma notable (ver figuras Nos. 4, 5 y 6 de la Lámina V para dosis elevadas).

A pesar de los resultados satisfactorios encontrados en estos estudios sería interesante realizar pruebas de la misma naturaleza con polen de C. arabica, controlando otros factores como por ejemplo la temperatura, que influye grandemente en estos procesos (84), y el pH (Berg, Sisa, King y Johnston, Kubo, etc. citados por Johri y Vasil, 37), Varas (93) y otros.

El primer ensayo con ácido bórico (Cuadro Nº 6 y figuras de la Lámina VI) demuestra el efecto desfavorable de esta sustancia a partir de 100 ppm: se observa un notable enrollamiento de los tubos que se acentúa más a 200 ppm. O'Kelley (68), Addicott (1), Resnik (77), Bose (5),y otros obtuvieron buenos resultados con concentraciones de 10 y 100 ppm, lo que indicaría que el polen de C. arabica es sensible a las altas concentraciones de boro pero, en cambio, se aprecia un ligero incremento en el porcentaje de germinación.

El segundo ensayo utilizando dosis mucho más bajas de nuevo demuestra que el boro a 50 ppm tiene un efecto benéfico en la germinación del polen pero no así en las longitudes de tubos.

El hecho de que en el primer experimento haya diferencia significativa en la longitud de los tubos del tratamiento con 50 ppm de ácido bórico y que en el segundo no haya tal superioridad aceptable, demuestra que el medio de cultivo con 10% de sacarosa y 0.2% de agar es mejor que 15% de sacarosa y 0.2% de agar. Interpretando estos

resultados en forma tentativa se puede decir que un buen sustrato germinativo a base de sacarosa y agar puede ser suficiente en las pruebas de viabilidad del polen de C. arabica.

En general, los efectos producidos por la adición de ácido bórico al medio de cultivo en el caso del polen de café arábico no fueron tan espectaculares como los observados por otros autores en otras especies (5, 13, 50, 68, 76, 77, 89, 94). Esto tal vez podría explicarse en el sentido de que las plantas de las cuales se colectaron las muestras de polen están lo suficientemente dotadas de este microelemento, puesto que las dosis más bajas casi fueron indiferentes, pero a medida que se aumentaron produjeron efectos deletéreos (ver figuras Nos. 3 y 4 de la Lámina VI).

Los resultados obtenidos con las 5 concentraciones de ácido giberélico (31.25, 62.5, 125, 250 y 500 ppm) demuestran que estas concentraciones no son beneficiosas para aumentar el crecimiento del tubo polínico. Los tubos más largos se encontraron en el control, cuyas dimensiones fueron superiores a las de todos los tratamientos y a medida que se aumentó la concentración esta disminución fue más marcada; en cambio 500 ppm de ácido giberélico aumentó el porcentaje de germinación, por lo menos así lo confirma el análisis de la variancia.

Estos resultados corroborarían, al igual que otros ensayos anteriormente mencionados, que la germinación es un proceso independiente del crecimiento del tubo polínico.

Sin embargo, en ningún caso estos tratamientos fueron tan notables en el incremento de la germinación y crecimiento del tubo polínico como los encontrados por Chandler (11); Kato (38) que en polen de Lilium

observó que con 50 ppm de AG se producen tubos 5 veces mayores que el control; y Bose (5) que en polen de arvejas obtuvo resultados sorprendentes (tubos 7 veces mayores que el control) por acción de la giberelina con dosis de 0.05 ppm aunque no observó aumento en la germinación. Esto hace suponer que tal vez ensayando dosis más bajas de esta sustancia en la germinación de polen de C. arabica se podrían obtener efectos mejores que los encontrados en el presente estudio.

En los resultados obtenidos las 6 dosis de ácido naftaleno acético (25, 50, 100, 200, 300 y 400 ppm) fueron completamente nocivas para la germinación del polen de café. Estudios en que se han usado diferentes sustancias promotoras de crecimiento, demostraron que el ANA es el menos beneficioso en la germinación y crecimiento de los tubos polínicos que cualquier otra auxina (76, 84, 89). En cambio en polen de café ni siquiera se observó una ligera influencia con esta sustancia, pero podrían ensayarse dosis mucho menores; no obstante, el añadir cualquier sustancia al medio de cultivo en concentraciones mínimas requiere una gran labor que no justificarían los pequeños aumentos que se pudieran lograr.

Muchos autores informan sobre los efectos beneficiosos que ocasionan partes del gineceo añadidas al medio de cultivo, incluyendo algunas veces efectos quimiotrópicos (1, 7, 41, 49, 91, etc.), pero nuestras experiencias con polen de cafeto arábico demuestran que los estigmas no producen tales influencias. Por el contrario, los estigmas disminuyen la longitud de los tubos pero no influyen en el porcentaje de germinación (Cuadro Nº 11). Estos efectos son muy similares al que producen

las anteras añadidas al medio. Ambos tratamientos al 1% de probabilidades son inferiores al control, lo mismo que el experimento comparativo del control vs. media antera (Cuadro Nº 12).

Aquí surgiría una pregunta: de qué naturaleza es la sustancia que se encuentra en anteras y aún en estigmas que inhiben el desarrollo de los tubos? Nada se sabe al respecto y sólo estudios cuidadosos podrán aclarar este asunto.

Por otra parte, es interesante notar que en el caso del experimento con y sin anteras se encontraron diferencias significativas entre bloques, que hacen suponer la variación de la viabilidad del polen de flor a flor en C. arabica, debido a que en este ensayo en cada repetición únicamente se utilizó polen de una sola flor. Esto confirma lo encontrado por otros autores en el mismo sentido.

Los ensayos de germinación de polen separado de las anteras de 'Typica' y 'Bourbon' en desecadores con cloruro de calcio, sílica gel y óxido de calcio, permiten establecer que las mejores sustancias desecantes son cloruro de calcio y sílica gel; el óxido de calcio resultó ser inefectivo, a pesar de que Ferwerda (27) logró conservar polen de 'Robusta', 'Excelsa' e híbridos interespecíficos por más de un mes utilizando esta misma sustancia.

De los dos primeros parece ser más efectiva la sílica gel (Cuadro Nº 13 y Gráficos Nos. 1, 2, 3 y 4). Teniendo en cuenta lo sugerido por Mendes (60) que 10% de germinación es ya un porcentaje muy bajo, se puede decir que con sílica gel se logró conservar polen de C. arabica, 'Typica' y 'Bourbon', durante 60 días y en cloruro de calcio 50 días para el cultivar 'Typica' y 30 para 'Bourbon'. En el caso de 'Typica'

el tiempo de conservación es suficiente para lograr los objetivos que se persiguen con este tipo de estudios, ya que las floraciones en café en las condiciones de Turrialba no se prolongan más allá de dicho período.

Por otra parte, considerando que el polen se conserva mejor en la oscuridad y a bajas temperaturas (19, 20, 22, 33, 40, 41, 56, 64, 70, 7 72, 73, 74, 75), condiciones que no se tuvieron en cuenta en este experimento, se puede decir que utilizando estos desecantes sobre todo sílica gel, podría aumentarse por tiempo la conservación de polen de C. arabica. Sin embargo, es muy interesante el hecho de que empleando esta sustancia Devreux y otros (18), y Medina y Conagin Mendes (56) utilizando cloruro de calcio, no lograron buenos resultados con polen de C. canephora y C. dewevrei, respectivamente, a pesar de que estos últimos autores usaron refrigeración en dichos estudios.

Mendes (57) encontró que el polen de C. arabica (variedades 'Semperflorens' y 'Caturra') es binucleado 3 ó 4 días antes de la apertura de las flores y que el núcleo reproductivo se divide en el tubo polínico. Teniendo en cuenta lo expuesto por Brewbaker (6) en el sentido de que el polen binucleado se conserva por más tiempo que los trinucleados, es muy probable que controlando mejor las condiciones de almacenamiento el polen de C. arabica podría conservarse por un período más largo. De ahí que se sugiere llevar a cabo un estudio considerando todos los factores que pudieran influir en la conservación de la viabilidad del polen de C. arabica, que sería muy provechoso para poder conservar polen por más tiempo con el objeto de obtener mutaciones, si tenemos en cuenta lo sugerido por Cartledje, Murray y Blakeslee, citados por Nebel (63).

También sería interesante realizar ensayos de capacidad de fertilización del polen almacenado en pruebas de campo, ya que muchas veces el polen conservado no germina bien en el medio de cultivo, dando buenos resultados en experimentos in vivo. Además, sería conveniente probar lo encontrado por Nebel (63), Nebel y Ruttle (64), y Pfeifer (74, 75), quienes lograron reactivar polen que parecía muerto colocándolo en condiciones apropiadas de humedad.

Los ensayos realizados en botones de flores normales para determinar cuándo los estigmas son más receptibles y si son o no polinizados antes de la apertura de la flor en C. arabica, demuestran que la mayor receptibilidad de los estigmas se presenta el mismo día de la apertura de las flores. Cuando se polinizan 2 veces (el día de apertura y posterior) se tiene un porcentaje de fructificación más bajo, el cual posiblemente se debe al proceso de manipulación de las ramas con este tratamiento (3 embolsados y 2 desembolsados), ya que los estigmas son muy delicados, porque sería ilógico que si una flor es polinizada en la época de su mayor receptibilidad y aún se asegura la fertilización con otra polinización, se logre un número de frutos mucho menor. Sin embargo, estos resultados estadísticamente no son diferentes al nivel de 5% y esta diferencia puede deberse al azar. Estas suposiciones anotadas anteriormente se ven reforzadas por lo encontrado en un ligero experimento realizado más que todo para practicar la técnica de castración, embolsado y polinización, en el cual se encontró lo siguiente: de 72 botones polinizados el mismo día se lograron 24 frutos (33.33% de fructificación); de 57 botones polinizados el segundo día se obtuvieron 32 frutos (56.14%); de 31 botones polinizados el segundo y tercer día

se obtuvieron 26 frutos (83.9% de fructificación).

Volviendo a lo anterior, vemos que los porcentajes de fructificación logrados (Cuadro Nº 14) son inferiores a 80% obtenido por Krug (43) utilizando la misma técnica de polinización, pero superiores a los de Stoffels (86),quien utilizando bolsas de muselina parafinada obtuvo 59.4%.

El 18% de fructificación obtenido de los botones castrados antes de la apertura de la flor demuestra que hay dehiscencia del polen en el botón cerrado, pero no tan alta como para asegurar una mayor fertilización, ya que basándonos en el pequeño experimento preliminar enunciado anteriormente, parece que antes de la apertura de las flores los estigmas ya son receptibles aunque no completamente. Sin embargo, este porcentaje de fructificación es superior a 9% encontrado por Stoffels (86) en el Africa Central y a 13.7% hallado por Elgueta (24) en Turrialba. Esto podría explicarse tal vez por el hecho de que a los 8 días cuando se quitaron las bolsas todavía los estigmas estaban túrgidos y hubieran sido polinizados con el polen de algunas flores tardías, aunque estas posibilidades son muy remotas.

El efecto de la gravedad sobre la polinización cruzada parece tener mucha importancia porque la mayoría de las ramas con el tratamiento de flores castradas y dejadas a libre polinización, por el azar estuvieron situadas en la parte inferior de las plantas, lo que dio como consecuencia que en una repetición (VIII)se lograran los 25 frutos porque en la parte superior de esta rama se encontraba gran cantidad del follaje de un árbol vecino. Como resultado de este tratamiento se obtuvo 52.23% de fructificación; considerando 18.22% de fructificación normal antes de la apertura de la flor se podría decir a grosso modo que hay un 34% de

fructificación debida a agentes naturales de polinización, porcentaje muy superior al encontrado por Carvalho y Krug (10) que fue de 7.3 a 9%, dándole estos autores mayor importancia como agente polinizador al viento, a pesar de que Stoffels (86) no considera tan preponderante a dicho agente. Por lo expuesto anteriormente, se atribuye más importancia a la gravedad, ya que es menos probable que los insectos visiten las flores en que se han suprimido las corolas y además esta suposición se ve reforzada por los estudios de Nogueira y otros (66) que demostraron la importancia secundaria de los insectos en la polinización cruzada.

León, citado por Sybenga (88), indica que la polinización de las flores que abren por la tarde se realiza al día siguiente de su semiapertura, pero el 12.57% de fructificación logrado en flores castradas de este tipo y protegidas con bolsas de papel demuestra que más o menos la quinta parte de ellas se poliniza el mismo día de su semiapertura, porque en las flores marcadas que sirvieron de control se obtuvo 60.92% de fructificación (ver Cuadro Nº 15).

En cambio, el 50% de fructificación con flores semiabiertas y polinizadas al tercer día nos estaría indicando que tal vez la receptibilidad del estigma disminuye en relación al tiempo. El análisis estadístico confirma tal suposición, ya que el control fue superior a este tratamiento al nivel de 1% de probabilidades.

El experimento llevado a cabo para determinar el efecto de la fertilidad del polen irradiado nos demuestra que el polen de café puede resistir fácilmente hasta dosis de 1600r, puesto que no se encontraron diferencias significativas en la producción de frutos obtenidos con polen

irradiado a dosis de 400, 800 y 1600r comparados entre ellos ni comparados con los de polen sin irradiar (testigo).

Koller (42) indica que una de las condiciones para que la germinación del polen irradiado pueda ocurrir normalmente es que debe haber un núcleo generativo diferenciado en el polen, lo cual es normal en el polen de café arábico 3 ó 4 días antes de la dehiscencia, Mendes (57). Esto explicaría lo encontrado en nuestros resultados.

Nishiyama (65) demostró que el polen de 4 especies probadas es más resistente que las semillas secas, pues a dosis de 1×10^5 r estos tipos de polen germinan tan bien como el control; sin embargo, concluye diciendo que es dudoso que la fertilización se produzca con polen irradiado a estas dosis.

El hecho de haber obtenido un porcentaje muy bajo de semilla amarilla (no cruzada) hace suponer que hubo polinización y fertilización antes de la apertura de la flor, o la posibilidad de que estas semillas fueran haploides del mutante 'Cera' originadas por inducción del polen irradiado.

Demostrado así que el polen de café tolera dosis relativamente altas de irradiación se abre un nuevo campo para la investigación referente a la determinación de heterosis en esta especie, tal como lo sugiere Osborne (71) para especies perennes.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente estudio se llevó a cabo con el objeto de determinar las características morfológicas del grano de polen, los medios adecuados para su germinación (ensayando también algunas sustancias promotoras de crecimiento) y los procesos de polinización en C. arabica L., llegándose a las siguientes conclusiones:

1. El grano de polen en C. arabica L. es esférico suboblado, tricolpado, con exina reticulada.

2. El tamaño del polen varía mucho según su origen, pero de los 3950 granos medidos se tiene un promedio de 31.23 micras.

3. Las concentraciones de agar y sacarosa más adecuadas para la germinación y más que todo para el crecimiento del tubo polínico son: 0.2, 0.5 y 1% de agar, y 10 y 15% de sacarosa. Las altas concentraciones de estas sustancias no son beneficiosas para lograr un desarrollo normal del tubo polínico.

4. El ácido bórico añadido al medio en concentraciones que variaron de 10 a 200 ppm, muestran que 50 ppm son beneficiosas para incrementar la germinación y crecimiento del tubo polínico, las dosis bajas no causan ningún efecto, pero las altas desde 100 ppm producen arrugamiento notable y disminución de la longitud del tubo.

5. El ácido giberélico ensayado a dosis de 31.25 a 500 ppm muestra un efecto deletéreo de esta sustancia en el crecimiento del tubo polínico, el cual se acentúa a medida que se aumenta la concentración; en cambio 500 ppm aumenta el porcentaje de germinación, a pesar de producir tubos muy pequeños.

6. El ácido naftaleno acético en todas las dosis probadas es completamente nocivo para la germinación y crecimiento de los tubos polínicos.

7. Los estigmas macerados y añadidos al medio de cultivo no afectan la germinación pero sí el crecimiento del tubo polínico al cual inhiben. No se observaron efectos quimiotrópicos de los tubos polínicos hacia los estigmas.

8. Las anteras añadidas al medio de cultivo tampoco afectan la germinación pero sí disminuyen el crecimiento de los tubos polínicos sobre todo de los que se encuentran más cerca de ellas.

9. Los estudios de conservación de polen de C. arabica muestran que la mejor forma de conservarlo es separándolo de las anteras y en desecadores con sílica gel y cloruro de calcio, siendo un poco más beneficiosa sílica gel. En estas condiciones y a temperatura de laboratorio y luz perenne se puede conservar la viabilidad del polen por más de 80 días, aunque a los 70 y 80 días dan porcentajes de germinación inferiores a 10% y tubos cada vez más pequeños.

10. Las polinizaciones en botones de flores normales muestran que los estigmas son receptibles antes de la apertura de la flor, pero es mucho mayor el mismo día de la apertura. La gravedad parece tener un efecto notable en la polinización de C. arabica.

11. Más o menos la quinta parte de las flores que abren por la tarde se polinizan el mismo día de su semiapertura, pero la mayor parte lo hacen al siguiente día.

12. La fertilidad del polen de C. arabica no disminuye al ser irradiado. Soporta muy bien las dosis de 1600r.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The objectives of the present study were to determine the morphology characteristics of the pollen grain, the adequate media for their germination (using growth promoting substances as well), and the pollination processes in C. arabica L.

The results obtained were as follows:

1. The C. arabica pollen grain is spheric to oblate, tricolpate, with reticulate exine.

2. There is great variation in pollen size according to origin but of the 3950 grains measured an average size of 31.23 micras was observed.

3. The most adequate concentrations of agar and saccharose for germination and especially for pollen-tube growth are 0.2, 0.5 and 1% agar,and 10 and 15% saccharose. Higher concentrations of these substances are not beneficial for normal development of the pollen tube.

4. When boric acid was added to the medium in concentrations varying from 10 to 200 ppm it was observed that 50 ppm are beneficial for increasing germination and pollen-tube growth. Low doses had no effect, but high ones from 100 ppm cause considerable shrivelling and decrease in pollen tube size.

5. Gibberellic acid applied in doses from 31.25 to 500 ppm results in an inhibiting effect of this substance on pollen-tube growth. This effect increases with increases in concentration; 500 ppm, however, increases germination percentage in spite of producing very small pollen tubes.

6. Naphthalene acetic acid inhibits germination and pollen-tube growth completely in all the doses tested.

7. Macerated stigmas added to the growth medium do not affect germination but inhibit pollen-tube growth. No chemotropism was observed of the pollen tubes toward the stigmas.

8. Anthers added to the culture medium did not affect germination either, but decreased pollen-tube growth, especially of those closest to the anthers.

9. Pollen storage studies in C. arabica showed that the best way of storing it is to separate it from the anthers and placing it in dessiccators with silica gel and calcium chloride. Silica gel is most favorable. Under these conditions, at room temperature and continuous light, pollen viability can be kept for more than 80 days, although 70 and 80 days give germination percentages lower than 10% and smaller tubes.

10. Pollination of normal flower buds showed that the stigmas are receptive before the flower opens, but are much more so on the day of opening. Gravity seems to have a notable effect on C. arabica pollination.

11. Approximately one fifth of the flowers that open in the afternoon are pollinated on the same day that they open, but the larger part do so on the next day.

12. Pollen fertility of C. arabica is not decreased by irradiation in doses even up to 1600r.

LITERATURA CITADA

1. ADDICOTT, F. T. Pollen germination and pollen tube growth as influenced by pure growth substances. Plant Physiology 18(2):270-279. 1943.

2. ARIYASU, T. (The effect of density of sowing of pollen on artificial media on germination and pollen-tube growth). Shokubutsugaku Zasshi Bot. Mag. (Japan) (72):473-476. 1959. (Original not available for examination, abstracted in Plant Breeding Abstracts 30(3):449. 1960).

3. BATJER, L. P. & THOMPSON, A. H. Effect of boric acid sprays applied during bloom upon the set of pear fruits. American Society for Horticultural Science. Proceedings 53:141-142. 1949.

4. BELL, C. R. Mineral nutrition and flower to flower pollen size variation. American Journal of Botany 46(9):621-624. 1959.

5. BOSE, N. Effect of giberellin on the growth of pollen tubes. Nature 184(4698):1577. 1959.

6. BREWBAKER, J. L. Biology of angiosperm pollen grain. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 19(2):121-133. 1959.

7. BRINK, R. A. The physiology of pollen. IV Chemotropism; effects on growth of grouping grains; formation and function of callose plugs; summary and conclusions. American Journal of Botany 11(7):417-436. 1924.

8. BULLOCK, R. M. & OVERLEY, F. L. Handling and application of pollen to fruit trees. American Society for Horticultural Science. Proceedings 54:125-132. 1949.

9. CALZADA BENZA, J. Experimentación agrícola con aplicación a la ganadería. Lima, Perú, Ediciones Agroganaderas S.A., 1953. 360 p.

10. CARVALHO, A. & KRUG, C. A. Agentes de polinização da flor do cafeiro (Coffea arabica L.). Bragantia 9(1-4):11-24. 1949.

11. CHANDLER, C. The effect of giberellic acid on germination and pollen tube growth. Contributions from Boyce Thompson Institute 19(2):215-223. 1957.

12. CONGER, A. D. Culture of pollen tubes for cromosomal analysis at the pollen tube division. Stain Technology 28(6):289-293. 1953.

13. COOPER, W. C. Vitamins and the germination of pollen grains and fungus spores. Botanical Gazette 100(4):844-852. 1939.

14. COSTE, R. Les caféiers et les cafés dans le monde. Tome I. Les caféiers. París, Editions Larose. 1955. 381 p.

15. CRAMER, P. J. S. A review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba, Costa Rica, SIC Editorial, Inter-American Institute of Agricultural Sciences, 1957. 262 p.

16. CRAWFORD, C. L. Effectiveness of date pollen following cold storage. American Society for Horticultural Science. Proceedings 35:91-95. 1937.

17. DANDLIKER, W. B., COOPER, W. C. & TRAUB, H. P. Vitamin B_1 and the germination of pollen. Science 88(2296):622. 1925.

18. DEVREUX, M., VALLAEYS, G., POCHET, P. et GILLES, A. Recherches sur l'autostérilité du caféier Robusta (Coffea canephora Pierre). Publications de l'Institut National pour l'Etude Agronomique du Congo Belge (INEAC), Serie Scientifique Nº 78. 1959. 44 p.

19. DUBLIN, P. Recherches sur la floraison et la fructification du caféier de la 'Nana'. L'Agronomie Tropicale 12(2):173-208. 1957.

20. _____. Biologie florale du Coffea dewevrei De Wild Race 'Excelsa' A. Chevalier. I. Microsporogénèse et étude du gamétophyte male. L'Agronomie Tropicale 12(5):576-594. 1957.

21. _____. Biologie florale du Coffea dewevrei De Wild Race 'Excelsa' A. Chevalier. III. Floraison, pollinisation, fecundation. L'Agronomie Tropicale 15(2):189-212. 1960.

22. DUFFIELD, J. W. & SNOW, A. G. Pollen longevity of Pinus strobus and Pinus recinosa as controlled by humidity and temperature. American Journal of Botany 28(2):175-177. 1941.

23. EIGSTI, O. J. The effects of colchicine upon the division of the generative cell in Polygonatum, Tradescantia, and Lilium. American Journal of Botany 27(7):512-524. 1940.

24. ELGUETA, M. Un programa de selección para Coffea arabica. Turrialba 1(1):37-43. 1950.

25. ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms (An introduction to palinology. I). Stokholm, Alquist and Wiksell. 1952. 539 p.

26. FERNHOLZ, D. L. & HINES, L. Preliminary storage experiments with pollen of tung (Aleurites fordii Hemsf.). American Society for Horticultural Science. Proceedings 40:251-254. 1942.

27. FERWERDA, F. P. Kiemkracht en Levensduur van Koffiestuifmeel. Archief voor de Koffiecultuur in Nederlandsch-Indië. 11(2):135-150. 1937.

28. _____. Coffee breeding in Java. Economic Botany 2(3):258-272. 1948.

29. FLORY, W. S. & TOMES, M. L. Studies of plum pollen, its appearance and germination. Journal of Agricultural Research 67(9):337-358. 1943.

30. FONT'QUER, P. Diccionario de Botánica. Barcelona, Editorial Labor, 1953. 1244 p.

31. FOWELL, R. R. Biology staining schedules for first year students. 6th ed. London, H. K. Lewis & Co. Ltd., 1959. 27 p.

32. GRIGGS, W. H., VANSELL, G. H. & IWAKIRI, B. T. The storage of hand-collected and bee-collected pollen in a home freezer. American Society for Horticultural Science. Proceedings 62:304-305. 1953.

33. HARRISON, G. J. Storage of cotton pollen. Journal of Agricultural Research 49(10):891-896. 1934.

34. HAYES, H. K., IMMER, F. R. & SMITH, D. C. Methods of plant breeding. 2nd ed. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1955. 551 p.

35. JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1940. 523 p.

36. JOHNSON, L. & GRIFFITHS, A. Effect of temperature and humidity on the longevity of Hemerocallis pollen as measured by its ability to effect capsule and seed set. American Society for Horticultural Science. Proceedings 55:507-512. 1950.

37. JOHRI, B. M. & VASIL, I. K. Physiology of pollen. The Botanical Review 27(3):325-381. 1961.

38. KATO, Y. Responses of plant cells to giberellin. Botanical Gazette 117(1):16-24. 1955.

39. KING, J. R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. Stain Technology 35(4):225-227. 1960.

40. _____ & HESSE, C. O. Pollen longevity studies with desiduous fruits. American Society for Horticultural Science. Proceedings 36:310-313. 1936.

41. KNOWLTON, H. E. Studies in pollen, with special reference to longevity. New York (Cornell) Agricultural Experiment Station Memoir:52:751-793. 1922.

42. KOLLER, P. C. The effects of radiation on pollen grain development, differentiation, and germination. Royal Society of Edinburgh. Proceedings 61(4):398-429. 1943.

43. KRUG, C. A. Hybridization of coffee. Journal of heredity 26(8): 325-330. 1935.

44. _____. Cytological observations in Coffea. III. Journal of Genetics 34(3):399-414. 1937.

45. _____. Melhoramento do cafeeiro. Doze anos (1933 a 1944) de pesquisas básicas e aplicadas realizadas nas Seções de Genética, Café e Citologia do Instituto Agronômico. Boletim da Superintendencia dos Serviços do Cafe, São Paulo 20(222):863-872. 1945.

46. _____ & CARVALHO, A. The genetics of Coffea. Advances in Genetics 4:127-158. 1950.

47. _____ & COSTA, A. S. Producción de variedades mejoradas de cafetos. La Hacienda 42(1):49-51. 1947.

48. _____ & MENDES, A. J. T. Observações citológicas em Coffea. IV. Bragantia 1(6):467-482. 1941.

49. LINK, A. J. & BLAYDES, C. W. Demonstration of the chemotropism of pollen tubes in vitro in four plant species. The Ohio Journal of Science 60(5):274-278. 1960.

50. LOO, T. L. & HWAN, T. CH. Growth stimulation by manganese sulphate, indole-3-acetic acid and colchicine in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany 81(6):356-367. 1944.

51. MASHKIN, S. I. Use of heteroauxin to stimulate pollen germination and growth of the pollen tubes in some fruit-bearing crops. Fiziologiya Rastenii (Plant Physiology) 6(3):384-386. 1959.

52. McGUIRRE, D. C. Storage of tomato pollen. American Society for Horticultural Science. Proceedings 60:419-424. 1952.

53. MEDINA, D. M. Observações citológicas em Coffea. XIII. Observações preliminares em Coffea arabica L. var. rugosa K.M.C. Bragantia 9(1-4):47-51. 1949.

54. _____. Observações citológicas em Coffea. XIV. Microsporogênese em Coffea arabica L. var. rugosa K.M.C. Bragantia 10(2):61-66. 1950.

55. _____. Observações citológicas em Coffea. XIX. Microsporogênese em Coffea dewevrei. Bragantia 12(4-6):153-162. 1952.

56. MEDINA, D. M. & CONAGIN, C. H. T. MENDES. Autoincompatibilidade em C. dewevrei de Willd et Th. Dur. Bragantia 18(19):283-293. 1959.

57. MENDES, A. J. T. Observações citológicas em Coffea. XV. Microsporogênese em Coffea arabica L. Bragantia 10(3):79-87. 1950.

58. _____ & BACCHI, O. Observações citológicas em Coffea. V. Uma variedade haploide ("Di-haploide") de C. arabica L. Instituto Agronomico de Campinas, Boletim Technico Nº 77. 1940. 26 p.

59. _____, MEDINA, D. M. & MENDES CONAGIN, C. H. T. Citologia do desenvolvimento dos frutos sem sementes no café 'Mundo Novo'. Bragantia 13(22):257-279. 1954.

60. MENDES, C. H. T. Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero Coffea. Bragantia 9(1-4):35-41. 1949.

61. _____. Observações citológicas em Coffea. XVI. Microsporogênese em Coffea canephora Pierre ex Froehner. Bragantia 10(4):97-104. 1950.

62. NAMBIAR, M. C. Pollen irradiation and culture of pollen tubes of coconut. Current Science 29(8):417-418. 1960.

63. NEBEL, B. R. Longevity of pollen in apple, pear, plum, peach, apricot, and sour cherry. American Society for Horticultural Science. Proceedings 37:130-132. 1939.

64. _____ & RUTTLE, M. L. Storage experiments with pollen of cultivated fruit trees. Journal of Pomology and Horticultural Science 14(4):347-359. 1937.

65. NISHIYAMA, I. & TSUKUDA, S. Radiobiological studies in plants. I. Effect of X rays upon pollen germination and fertility. Idengaku Zasshi (Japan) (34):663-672. 1959. (Original not available for examination, abstracted in Plant Breeding Abstracts 30(3):449. 1960).

66. NOGUEIRA, P., CARVALHO, A. & ANTUNES FILHO, H. Efeito da exclusão dos insectos polinizadores na produção do café 'Bourbon'. Bragantia 18(29):441-468. 1959.

67. OBERLE, G. D. & WATSON, R. The use of 2, 3, 5 - Triphenyl tetrazolium chloride in viability test of fruit pollens. American Society for Horticultural Science. Proceedings 61:299-303. 1953.

68. O'KELLEY, J. C. External carbohydrates in growth and respiration of pollen tubes in vitro. American Journal of Botany 42(3): 322-327. 1955.

69. O'KELLEY, J. C. Boron effects on growth, oxigen uptake and sugar absorption by germination pollen. American Journal of Botany 44(3):239-244. 1957.

70. OLMO, H. P. Storage of grape pollen. American Society for Horticultural Science. Proceedings 41:219-224. 1942.

71. OSBORNE, THOMAS S. Past, present and potential uses of radiation in Southern plant breeding. In: Oak Ridge Regional Symposium Radiation in Plant Breeding, 9th. Oak Ridge, Tennessee. 1957. 5-10 p. Proceedings.

72. PFEIFFER, N. E. Longevity of pollen of Lilium and hibrid Amaryllis. Contributions from Boyce Thompson Institute 8(2):141-150. 1936.

73. _____. Viability of stored pollen Lilium. Contributions from Boyce Thompson Institute 9(3):199-211. 1938.

74. _____. Life of gladiolus pollen prolonged by controlled conditions of storage. Contributions from Boyce Thompson Institute 10(4):429-440. 1939.

75. _____. Prolonging the life of Cinchona pollen by storage under controlled conditions of temperature and humidity. Contributions from Boyce Thompson Institute 13(6):281-293. 1944.

76. RAGHAVAN, V. & BARUAH, H. K. Effect of time factor on the stimulation of pollen germination and pollen tube growth by certain auxins, vitamins and trace elements. Phisiologia Plantarum 12:441-451. 1959.

77. RESNIK, M. E. Fisiología y longevidad del polen en los Citrus. Revista de Investigaciones Agrícolas Buenos Aires. 12(3): 311-343. 1958.

78. SARTORIS, G. B. Longevity of sugar cane and corn pollen - a method for long - distance shipment of sugar cane by airplane. American Journal of Botany 29(5):395-399. 1942.

79. SASS, J. E. Botanical microtechnique. 3rd ed., Ames, Iowa, The Iowa State College Press. 1958. 228 p.

80. SCHROEDER, C. A. Pollen germination in avocado. American Society for Horticultural Science. Proceedings 41:181-182. 1942.

81. SELLING, O. H. Studies in Hawaiian pollen statistics. II. The pollens of the Hawaiian phanerogams. Göteborg, Bishop Museum Special Publication Nº 38. 1947. 430 p.

82. SINGH, S. N. Germination of pollen grains of Vitis vinifera. Current Science 28(6):258. 1959.

83. SMITH, P. F. The influence of 3-indole acetic acid on pollen germination. Science 90(2329):163-164. 1939.

84. _____. Studies of the growth of pollen with respect to temperature auxins, colchicine and vitamin B_1. American Journal of Botany 29(1):56-66. 1942.

85. SOOST, R. K. & CAMERON, J. W. Production of hibrids by use of stored trifoliate orange pollen. American Society for Horticultural Science. Proceedings 63:234-238. 1954.

86. STOFFELS, E. La sélection du caféier arabica a la station de Mulungu (Premieres communications). Boletin de l'Institut National pour l'Etude Agronomique du Congo Belge (INEAC), Serie Scientifique 11:1-41. 1936.

87. STONE, C. L., JONES, L. E. & WHITEHOUSE, W. E. Longevity of pistache pollen under various conditions of storage. American Society for Horticultural Science. Proceedings 42:305-314. 1943.

88. SYBENGA, J. Genética y citología del café. Una revisión de literatura. Turrialba 10(3):82-137. 1960.

89. THOMPSON, A. H. & BATJER, L. P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. American Society for Horticultural Science. Proceedings 56:227-230. 1950.

90. TRAUB, H. P. & O'RORK, C. T. Papaya pollen germination and storage. American Society for Horticultural Science. Proceedings 34:18. 1936.

91. TSAO, T-H. A study of chemotropism of pollen tubes in vitro. Plant Physiology 24(3):494-504. 1949.

92. TULECKE, W. The pollen of Ginkgo biloba: in vitro culture and tissue formation. American Journal of Botany 44(7):602-608. 1957.

93. VARAS, J. Factores que afectan la germinación del polen de cacao in vitro. Tesis. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1961. 65 p. (Mimeografiada).

94. VASIL, I. K. Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. American Journal of Botany 47(4):239-247. 1960.

95. VICENTE, E. La polinización del café, (una experiencia de hace 20 años realizada por Clorito Picado y el Prof. don Elías Vicente). Instituto de Defensa del Café, Costa Rica, Revista 17(148):501-502. 1947.

96. WOODEHOUSE, R. P. Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. New York and London, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1935. 574 p.

97. YAMADA, Y. The effect of cobalt on the growth of pollen I. Shokubutsugaku Zasshi Bot. Mag. (Japan) (71):319-325. 1958. (Original not available for examination, abstracted in Plant Breeding Abstracts 29(3):438. 1959).