

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y
ENSEÑANZA SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

// Cultivo de anteras en tres introducciones de *Coffea
arabica* para la obtención de complejos celulares
haploides

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

Magister Scientiae

por:

MARIA DEL ROSARIO JIMENEZ SANCHEZ

Turrialba, Costa Rica

1995

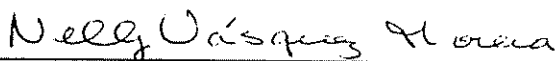
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

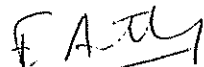
FIRMANTES:



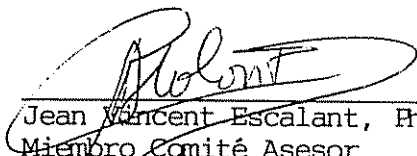
Magali Dufour, Ph.D
Profesor Consejero



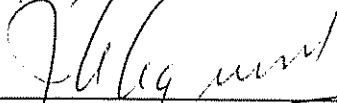
Nelly Vásquez Morera, MSc.
Miembro Comité Asesor



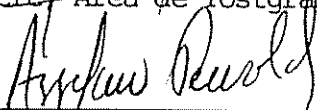
Francois Anthony, Ph.D
Miembro Comité Asesor



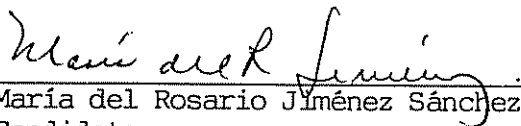
Jean Vincent Escalant, Ph.D
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre, Ph.D
Jefe Área de Postgrado



Assefaw Tewolde, Ph.D
Director, Programa de Enseñanza



María del Rosario Jiménez Sánchez
Candidato

A mis hijos, MELISSA y CARLOS ALBERTO

Con todo mi amor.

A mis padres, Lucía de Jiménez y Próspero Jiménez.

Por el esfuerzo realizado al educarme.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra me prestaron su colaboración y apoyo para la realización de esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Unidad de Biotecnología, por su desinteresado apoyo, sus muestras de amistad y camaradería.

A mi profesora consejera Magali Dufour por sus valiosas enseñanzas.

A mi profesora y amiga Nelly Vásquez por su amistad y gran ayuda en la revisión de este trabajo.

A mi comité asesor por sus valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo.

A la Universidad de Panamá, y en especial a mis compañeros del Departamento de Genética, Paco, Olga, Fela, E. Vega.

A mis padres y hermanos por su apoyo y amor.

Al personal de la Biblioteca Orton por su gran apoyo y muestras de amistad.

Al Prof. Assefaw Tewolde por su alto nivel de enseñanza y gran ayuda.

A todos mis compañeros de la Promoción 93-94 por su amistad y apoyo. En especial a Alberto Sánchez por su gran cariño y ayuda desinteresada que marcaron una gran diferencia en mi estadía en CATIE.

A mis queridas amigas y compañeras Vilma Vilchez, Isabel Herrera, Carmen Bieberach, Lilliam Rodríguez por brindarme la oportunidad de conocerlas. A mis compañeros Mario Paíz y Roger Villalobos por su gran sinceridad y amistad.

A Dario López de quien a pesar de todo, recibí apoyo y ayuda.

A Jhonny Pérez y Alberto Sánchez por su enorme ayuda y guía en el análisis estadístico de los resultados.

A Gonzalo Valverde y Keneth Royo por su gran colaboración en la realización de las ayudas técnicas.

I N D I C E

	Página
Resumen	viii
Abstract	x
Abreviaturas	xii
Lista de Cuadros	xiii
Lista de Figuras	xv
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Obtención de plantas haploides	5
2.1.1 Genotipo y estado fisiológico de la planta donadora	8
2.1.2 Estadio de desarrollo de las microesporas	9
2.1.3 Medios de cultivo	11
2.1.4 Condiciones culturales y preculturales de la planta donadora	12
2.2 Utilización de haploides en Fitomejoramiento.	14
2.3 Haplométodos en café	17
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1 Material vegetal	20
3.2 Explante a cultivar	20
3.3 Fase I: Características fenológicas del botón floral en relación al estadio de desarrollo de las microesporas	21
3.4 Fase II: Cultivo de anteras	21

3.4.1 Desinfección	21
3.5 Fase III: Pretratamientos ó Métodos preculturales	23
3.5.1 Choque térmico	23
3.5.2 Choque térmico y centrifugación	24
3.5.3 Choque osmótico	25
3.6 Fase IV: Medio de Cultivo	25
3.6.1 Inducción de callos	25
3.6.2 Inducción de embriones	26
3.6.3 Condiciones del cultivo	27
3.7 Estudios histológicos	27
3.8 Variables a medir	27
3.8.1 Fase I	27
3.8.1 Fase II	27
3.8.1 Fase III	28
3.8.1 Fase IV	28
3.9 Diseño Experimental y Análisis estadístico ..	28
4. RESULTADOS Y DISCUSION	29
4.1 Estudio del estado de desarrollo de las anteras	30
4.2 Métodos de Desinfección	35
4.2.1 Evaluación a los siete y quince días ...	36
4.2.1.1 Contaminación	36
4.2.1.2 Oxidación	38
4.2.1.3 Formación de callo	39
4.2.1.4 Viabilidad de las microesporas	44
4.3 Pretratamientos	48

4.3.1 Choque Térmico	48
4.3.2 Choque Térmico y Centrifugación	56
4.3.3 Choque Osmótico	60
4.3.3.1 Sacarosa 20% por 1 hora	60
4.3.3.2 Sacarosa 40% por 1 hora	62
4.4 Medios de Cultivo	63
4.4.1 Inducción de callos	63
4.4.2 Inducción de embriones	65
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES	69
7. LITERATURA CITADA	70
8. ANEXOS	80

Jiménez, Sánchez, María del Rosario. 1995. Cultivo de anteras en tres introducciones de *Coffea arabica* para la obtención de complejos celulares haploides. Tesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 93 p.

Palabras claves: Caturra, Garnica, Colombia, microesporas, androgenesis, pretratamiento, auxinas (2,4-D, AIB), citocinina (cinetina), estudio histológico.

R E S U M E N

Esta investigación tuvo como objetivo estudiar algunos factores importantes para el desarrollo de una metodología eficiente para la obtención de embriones haploides en tres introducciones de *C. arabica*: Caturra, Garnica y Colombia; utilizando el cultivo de anteras (androgénesis).

La investigación constó de cuatro fases: 1- Determinar el tamaño de botón floral correlacionándolo con el estado uninucleado del desarrollo de la microespora. 2- Probar cuatro métodos de desinfección y elegir el más eficiente. 3- Evaluar el efecto de algunos pretratamientos: térmico (5°C y 28°C), físico (centrifugación por 20, 40 y 60 minutos) y osmótico (sacarosa al 20 y 40%). 4- Estudiar varias combinaciones de fitohormonas (2,4-D, AIB y cinetina) y su acción sobre la formación de callo, así como en los medios de Pierson y Yasuda.

Las tres introducciones estudiadas mostraron diferencias en el tamaño del botón floral correlacionado con el estado uninucleado de las microesporas. Para Caturra fue de 7mm, Garnica de 8mm y Colombia de 8 a 9mm.

En cuanto a las desinfecciones se estableció que en general el uso de hipoclorito de Ca al 8% por 15 min., fue el método que causó la menor contaminación y oxidación de las anteras, mantuvo un buen nivel de viabilidad de las microesporas y permitió desarrollar un mayor número de callos.

El efecto de los pretratamientos sobre el número de callo es similar al del control en la mayoría de los casos, no se evidenció la producción de callo embriogénico en ninguno de ellos. Se destacó una interacción entre la temperatura la duración del pretratamiento y el medio de cultivo para los tres fenotipos, el desarrollo de los callos fue mayor cuando las anteras eran sometidas a pretratamiento de 5°C por dos días y sembradas en medio simple de Gamborg. Los estudios histológicos evidenciaron que en algunas anteras que fueron sometidas a 5°C por cuatro y ocho días mostraron microesporas con características que indicaban una próxima división: contenido de almidón y de lípidos, alto balance nucleo-citoplásmico.

El choque osmótico consistente de sacarosa al 20% por una hora en el cultivar Garnica, promovió una gran actividad nucleolar que usualmente precede a la división celular; sin embargo no se observó ninguna división. En el resto de los cultivares, ni en el control se observó la presencia de grandes nucleolos.

Para la inducción de callos utilizando 2,4-D y cinetina en medio básico de MS no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para las tres introducciones. Al contrario se observó una tendencia en el aumento del número de callos en tratamientos constituidos del medio B-5 y de AIB (2mg/l) + cinetina (0.5 y 1 mg/l) para los cultivares Caturra y Garnica. Al utilizar los medios de Pierson y Yasuda, para inducir la formación de embriones somáticos se logró un aumento continuo en el tamaño de los callos por cinco meses conservando su capacidad de dividirse.

Jiménez Sánchez; María del Rosario. 1995. Anther Cultivation in three *Coffea arabica* introductions for obtaining haploid cellular complexes. Master of Science. Thesis, Turrialba, Costa Rica, CATIE. 90 pp.

Key words: Caturra, Garnica, Colombia, microspores, androgenesis, pretreatment, auxins (2,4-D, AIB) and cytokinin (cinetin), histologic study.

A B S T R A C T

The investigation's objective was to examine factors important to the development of an efficient methodology for obtaining haploid embryos for three *C. arabica* introductions Caturra, Garnica and Colombia. Anther androgenesis technique has been used.

The investigation consisted of four phases: 1. Determining floral bud size correlated with uninucleate stage of microspore.

2. Testing four disinfection methods to chose the most efficient. 3. Evaluating effects of some pretreatments: thermal (5°C and 28°C), physical (centrifugation at 20, 40 and 60 minutes) and osmotical (sucrose at 20 and 40%). 4. Examining various phytohormonal combinations (2,4-D, IBA and kinetin) and their activity in callus formation in Pierson and Yasuda media.

The study of the three introductions demonstrated differences in floral bud size correlated with the uninucleate stage of microspores; Caturra was 7mm, Garnica 8mm and Colombia 8 and 9mm.

Regarding disinfections it was established that the use of 8% calcium hypochlorite for 15 minutes was generally the method which caused least contamination and anther oxidation.

Also it maintained good microspore viability and permitted development of maximum number of calli.

The effect of pretreatment's over the number of calli was similar to that of the control in the majority of cases.

Embriogenic calli production was not demonstrated in any case. An interaction was detected between temperature, duration of pretreatment and culture medium for the three genotypes. Calli development was highest when anthers were submitted to 5°C for two days and cultured in a simple Gamborg medium.

The hystologic studies showed that some anthers submitted to 5°C for four and eight days showed microspores with characteristics indicating a future division : starch and lipids high nucleo-cytoplasmic balance.

Osmotic shock consisted of 20% sucrose for one hour in Garnica culture: it promoted great nucleolar activity which usually precedes cellular division. However, no division was observed. Big nucleolis were not observed in the control or other treatments.

Significant differences were not found between treatments, for the induction of calli using 2,4-D and kinetin in a basic MS medium; this occurred for all three intoductions. On the other hand, a tendency in increasing calli quantity was observed in treatments consisting of B-5 medium and IBA (2mg/l) + Kinetin (0,5 and 1mg/l), for Caturra and Garnica cultures. Using Pierson and Yasuda media for inducing somatic embryo formation resulted in an 2increase in calli size for five months and maintain of dividing capacity

ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
AIB	Ácido indol butírico.
MS	Medio de Murashige y Skoog.
B-5	Medio de Gamborg et al.

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.	Página
Cuadro 1. Porcentaje de microesporas de café, en los diferentes estados de desarrollo, para las tres introducciones en estudio...	32
Cuadro 2. Porcentaje de anteras no contaminadas en cada método de desinfección por introducción. Evaluación a los siete días.	37
Cuadro 3. Porcentaje de anteras no oxidadas para cada desinfección por cultivar.....	38
Cuadro 4. Porcentaje de callos producidos, mediante el uso de tres métodos de desinfección, evaluados a los siete y quince días.....	41
Cuadro 5. Porcentaje de viabilidad de las microesporas, siete y quince días después de la siembra del material.	44
Cuadro 6. Prueba de Dunnett's. Comparación de los seis pretratamientos vs el control ante la variable producción de callos para tres cultivares de café.	50
Cuadro 7. Prueba de Tukey's para comparar las medias de los pretratamientos y el control ante la variable desarrollo de callo en café.	52
Cuadro 8. Prueba de Duncan para comparar el efecto de la sacarosa, sobre la viabilidad de las microesporas del cultivar Garnica. Evaluación a los 30 días.	62
Cuadro 9. Porcentaje de anteras viables para el cultivar Garnica. Evaluación a los 30 días...	62

Cuadro 10. Porcentaje de anteras con callo por introducción para los tratamientos uno, dos, tres y cuatro. Evaluación a los cinco meses. 64

Cuadro 11. Porcentaje de anteras con callos para los tratamientos cinco, seis, siete y ocho. Evaluación a los cinco meses. 65

LISTA DE FIGURAS

Figura #	Página
Figura 1. Tamaño de los botones florales para cada una de las introducciones. A, Garnica; B, Caturra; C, Colombia; D, aspectos generales del tamaño del botón seleccionado. Las flechas indican el tamaño del botón utilizado.	30
Figura 2. Estados en el desarrollo de las microesporas. A, microesporocitos (20x); B, tétradas (20x); C, estado uninucleado (20x), recuadro 40x (núcleo y nucleolo); D, estado binucleado (20 x 1.6x).	32
Figura 3. Porcentaje de microesporas en estado uninucleado en tres introducciones de <i>Coffea arabica</i> . CATIE, Costa Rica. Febrero, 1994.	34
Figura 4. Métodos de desinfección aplicados a tres cultivares de café, para la variable anteras no contaminadas. Evaluación a los siete días.	36
Figura 5. Métodos desinfección aplicados a tres cultivares de café, para la variable anteras no contaminadas. Evaluación a los 15 días	37
Figura 6. Evaluación de tres métodos de desinfección utilizando la variable número de callos en tres cultivares de café. Evaluación a los siete días.	40
Figura 7. Comparación de tres métodos de desinfección mediante la variable producción de callos en tres cultivares de café. Evaluación a los 15 días.	40

Figura 8. Desarrollo de callo a partir de anteras. A, callo que se forma sobre la pared; B, formación a partir de la base de la cicatriz del filamento; C, formación a partir del interior de la antera.	43
Figura 9. A, Comparación de microesporas viables (v) y no viables (nv). Obsérvese la diferencia en tamaño y contenido citoplasmático. B, aumento en tamaño y contenido citoplasmático de las microesporas. Obsérvese el núcleo y nucleolo bien definidos en el recuadro interior.	45
Figura 10. Evaluación de tres métodos de desinfección, midiendo la viabilidad de las microesporas en tres cultivares de café. Evaluación a los 15 días.	47
Figura 11. Tipo de células que conforman el callo. A, células largas (20x); B, células redondeadas con granos de almidón (20x)(1.6x).	49
Figura 12. Evaluación de la interacción tratamientos* medios de cultivo para la variable callos en café. Evaluación a los 30 días	53
Figura 13. A (20x) y B (20x)(1.6x), Desarrollo del callo a partir de las paredes internas de la antera.	54
Figura 14. Tipos de callo que se desarrollan a partir de la antera que ha recibido: A, pretratamiento Térmico; B, Térmico y Centrifugación; C medio de Yasuda.	57
Figura 15. Efecto de la temperatura y centrifugación sobre la producción de callo en anteras de café. Evaluación a los 30 días.	58

Figura 16. Estado de las microesporas después de ser sometidas a los pretratamientos de centrifugación y temperatura. A, 5°C x 2 días y 20 minutos de centrifugación; B, 5°C x 2 días y 40 minutos de centrifugación; C, 5°C x 2 días y 60 minutos de centrifugación; D, 5°C x 2 días E, 5°C x 4 días. m, microespora; a, almidón; p.a, paredes de la antera. 59

Figura 17. Estado de las microesporas después de ser sometidas a sacarosa al 20 y 40%. Nótese la viabilidad y germinación de algunas de ellas, así como la presencia de dos nucleolos. n nucleolos (20x) (1.6x); m, microespora (20x); tg, tubo germinativo; nv, no viable (20x).... 61

A N E X O S

Anexo	Página
Anexo 1a. Medio de Murashige y Skoog.	81
Anexo 1b. Medio de Pierson.	81
Anexo 2a. Medio de Gamborg et al.	82
Anexo 2b. Medio de Yasuda.	82
Anexo 3a. Medio de Ascanio I.	83
Anexo 3b. Fijador FAA.	83
Anexo 4a. Colorante de Alexander.	84
Anexo 4b. Aceto Carmín.	84
Anexo 4c. Iodo yoduro.	84
Anexo 4d. Cúadruple Coloración.	84
Anexo 5a. Proceso de deshidratación.	85
Anexo 5b. Composición iónica en meq/l de las soluciones minerales utilizadas.	85

1. INTRODUCCION

El café ha sido desde hace muchos años un rubro importante en la economía de los países del área. Esto se puede constatar al observar que dentro de la región, su cultivo ocupa 1.3 millones de hectáreas, que en gran medida son terrenos montañosos y quebrados que difícilmente podrían ocuparse con otro cultivo sin dañar los suelos (Fernández, 1988). Es también el producto agrícola más importante en el mercado internacional, actualmente su consumo se estima en 95.7 millones de sacos de café de 60 kg que representa de US\$9,000-12,000 millones anualmente, (Sondahl *et al.* 1991; Instituto de café de Costa Rica, 1994).

Juntos, los países del área (México, Centroamérica, Haití y República Dominicana) producen 14,407 millones de sacos de café, que vendría a ser el 15.7% de la producción mundial, situándolos después de Brasil y Colombia, los cuales abastecen el 43% del mercado mundial del café (Instituto del café de Costa Rica, 1994).

Existen dos especies de café extensamente cultivadas y por consiguiente de mayor interés comercial: *Coffea arabica* L y *C. canephora* Pierre. Nuestro interés recae en *C. arabica*, que representa el 99% de la producción cafetera de Latinoamérica. Es la especie más cultivada en el mundo (77.1%) y que produce la mejor calidad de café (Zuniga, 1980; Junne, 1990; Instituto del café de Costa Rica, 1994).

Coffea arabica en general es muy sensible al ataque de las principales enfermedades que afectan al café, como lo es el ataque de nemátodos (*Meloidogyne exigua*, *M. incognita*, *M. coffeicola*, *Pratylenchus sp.*), que pueden causar la muerte de la planta en pocos años. Según Sasser (1979), en Centroamérica, México y el Caribe las pérdidas ocasionadas

Por *M. exigua* son del orden del 10%. Por otro lado el ataque de un insecto, *Hypothenemus hampei* (broca del café), el cual perfora los frutos causando una baja en el peso y en la clasificación del mismo, la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), todas estas plagas han causado grandes pérdidas comerciales en África, Brasil y Centroamérica. Desde hace unos años existe en África una enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum coffeanum*, comunmente se conoce como "Coffee berry disease" (CBD) o antracnosis de la fruta la cual causa daños mayores en la cereza del café (Sondahl y Sharp, 1979; Montoya y Cárdenas, 1994; Guerreiro, 1992). Estas enfermedades son una de las principales razones por las cuales debemos introducir y/o crear variedades resistentes o tolerantes a ellas mediante el mejoramiento genético de la especie. Utilizando los métodos convencionales mejoramiento se necesitarían varios ciclos de retrocruces y esto podría realizarse en un lapso de tiempo que puede ir de 20 a 30 años, lo que desanima a muchos fitomejoradores. (Gálvez, 1976; Román y Cárdenas, 1988).

Con el desarrollo del cultivo de tejidos en los últimos años y especialmente el interés que ha causado el uso de haplométodos a partir del cultivo de anteras o microesporas *in vitro*, se crean nuevas perspectivas hacia la obtención de plantas homocigóticas (haploides diploidizados) en una generación y el acceso a nuevas formas recombinantes (Londoño y Orozco, 1986; Sondahl, 1989). Además una vez duplicados los haploides, ya sea de forma espontánea o inducida se establecen rápidamente líneas homocigóticas, (Gallais, 1978; Roca, *et al.* 1991). Esto permitiría reducir significativamente el tiempo que se utiliza en los programas convencionales de mejoramiento del café.

El potencial que posee el cultivo de anteras radica en la constitución genética de las microesporas. Las células

gaméticas son haploides y contienen la dotación genética de la planta paterna y las recombinaciones esperadas según las proporciones mendelianas. Los haplométodos permiten al mejorador seleccionar eficazmente los recombinantes deseables ya que el enmascaramiento de los genes recesivos por los genes dominantes desaparece en los haploides diploidizados. Con la constitución de líneas se pueden obtener híbridos F1 homogéneos lo cual es interesante para la producción de portainjertos (*C. canephora*).

Las células haploides, plantas haploides y dobles haploides eficientemente identificados, son de gran utilidad para seleccionar células resistentes a enfermedades, a sequía, tolerantes a salinidad y herbicidas, para selección de mutantes bioquímicos, transferencia de genes, producción de líneas cromosómicas aneuploides que permiten la obtención de nuevas variantes y formas, variación gametoclinal, fusión de protoplastos, análisis genético y estudio de la acción de genes, entre otras (Collins, 1978; Hu, 1985).

Este trabajo tiene como objetivo principal establecer y estandarizar las condiciones para la obtención de complejos celulares y/o embriones haploides, en tres variedades de *C. arabica*, utilizando el cultivo de anteras *in vitro*.

2. REVISION DE LITERATURA

El café es una Angiosperma de la familia Rubiaceae que incluye más de 500 géneros y cerca de 8,000 especies. El género *Coffea* fue descrito por Linnaeus en 1753, y consta de más de 100 especies. El género ha sido dividido en cuatro secciones, y *C. arabica* se encuentra dentro de la sección *Eucoffea*. Se le describe como nativo de las tierras altas de Etiopía, su posible origen no se conoce con exactitud puede ser resultado del cruce entre *C. canephora*, *C. congensis* y *C. eugenioides* ya que presentan muchas características morfológicas en común, y producen relativamente altos porcentajes de plantas híbridas (Sondahl y Sharp, 1979).

En los últimos años y utilizando las nuevas técnicas los marcadores moleculares (RAPD y RFLP), se tienen estudios preliminares que colocan a *C. eugenioides* en una relación filogenética cercana con *C. arabica*. Se piensa que es producto de la fusión de dos especies diploides, siendo las más cercanas genéticamente *C. canephora*, *C. congensis* y *C. eugenioides* (Cros et al, 1993).

C. arabica es un árbol generalmente de poca altura (2-4 m.), que se caracteriza por el dimorfismo de ejes; consiste de un eje vertical u ortotrópico del que salen ejes laterales o plagiotrópicos. Rara vez se encuentran plantas con porte natural, ya que en el cultivo se podan para adaptarlas a las necesidades de manejo y recolección (León, 1987).

Las flores en *Coffea*, brotan sólo de las axilas formadas por las hojas en ramas plagiotrópicas de un año de edad. En cada axila hay de una a cinco inflorescencias, originalmente colocadas en línea recta entre la rama y la hoja; este orden no se mantiene al crecer; la primera en abrirse es la más próxima a la rama (León, 1987).

La floración del café se presenta simultáneamente en toda una región y dura pocos días, esto se debe a varios factores como la duración del día y la precipitación. El número de floraciones varía según las normas de precipitación, por ejemplo en lugares con dos estaciones lluviosas hay dos floraciones principales (León, 1987). Generalmente la meiosis ocurre después de una fuerte lluvia que ha sido antecedida por varios días de sequía.

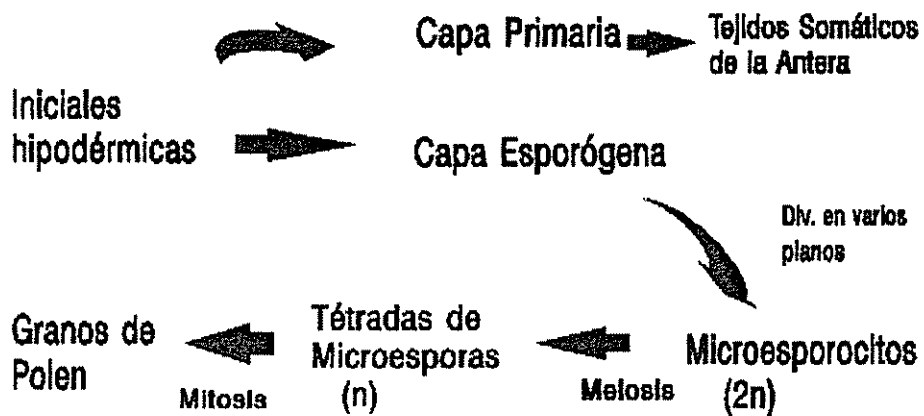
C. arabica es el único poliploide en el género, su complemento cromosómico es $2n=4x=44$. Los poliploides contienen más de dos juegos de cromosomas que pueden ser idénticos o diferentes dependiendo de si se trata de autopoliploides (poliploide con series múltiples idénticas o casi idénticas de cromosomas), o de alopoliploides (poliploide con series de cromosoma de origen diferente, derivados de dos o más especies). Estos pueden ser estériles o fértiles. En el caso de *C. arabica* es un alotetraploide que se comporta como un diploide durante la meiosis (Gardner, 1991 ; Monaco *et al.* 1977)

2.1 OBTENCION DE PLANTAS HAPLOIDES .

Las técnicas de haplométodos se basan en la desviación del curso ontogenético normal de la fase gametofítica (microesporas o megaesporas), hacia la formación de esporofitos haploides, este fenómeno puede ser espontáneo (natural) o inducido utilizando técnicas *in vitro*. Existen varias vías para lograr esta meta: androgénesis, ginogénesis, partenogénesis, etc. El proceso se llama androgénesis cuando las microesporas originan embriones y plantas (Roca, *et al.* 1991,); es la técnica que queremos estudiar.

Los microesporocitos o células madres del polen ($2n$) se

originan a partir de la capa esporógena primaria la cual sufre divisiones en diferentes planos. Luego se inicia el proceso de meiosis; el estímulo que desencadena la meiosis aún no es conocido, este proceso reduccional da origen a las tétradas de microesporas (n) las cuales son uninucleadas. Por mitosis se forma el grano de polen (Cel. generativa y vegetativa).



La microesporogénesis sigue dos patrones diferentes determinados por el tipo de citocinesis. En el tipo simultáneo no se forma pared después de la meiosis I, las tétradas formadas son de tipo decusada. El segundo tipo recibe el nombre de citocinesis sucesiva que se caracteriza por el desarrollo centrífugo de la célula que se forma después de la meiosis I y II. Las tétradas de microesporas que se forman por este método son tetraédricas o isobilaterales (Flores, 1994). Es el caso del café.

La desviación hacia la fase esporofítica generalmente se obtiene a través de la formación de callos y/o producción de embriones; las plantas se regeneran vía organogénesis proveniente de estos callos o vía embriogénesis, y también

pueden ser obtenidas directamente por la germinación de embriones androgénicos (Radojevic y Kovoov, 1986; Zhang y Lespinasse, 1992).

El origen de la respuesta androgenética puede ser variado:

- . la célula vegetativa del polen se divide y la célula reproductora degenera.
- . los núcleos vegetativo y generativo son idénticos y ambos participan en la embriogénesis.
- . existe fusión entre dos células haploides y se desarrolla un embrión diploide.
- . la célula vegetativa degenera y la célula reproductora se desarrolla (caso más escaso) (Nitsch, 1970).

Los haplométodos inducidos son característicos del mundo vegetal, ya que embriones de origen androgénico fueron obtenidos en más de sesenta especies. Se han desarrollado cuatro técnicas para la inducción de androgénesis *in vitro* : a) cultivo de anteras, b) aislamiento del polen proveniente de anteras precultivadas, c) cultivo de polen aislado directamente, d) cultivo de polen por medio de técnica de flotación (Sangwan, Sangwan-Norreel 1987). De las cuatro, el cultivo de anteras es la técnica más generalizada para provocar dicho proceso.

La primera planta haploide regenerada a partir de cultivo de anteras fue obtenida por Guha y Maheshwari (1964) trabajando con *Datura innoxia*, método que se ha extendido rápidamente a cultivos económicamente importantes.

Los resultados publicados utilizando esta técnica son prometedores; así vemos como a través del cultivo de anteras en *Gramineae* se han regenerado plantas de arroz (Niizeki y Oono, 1968; Yadav, *et al.* 1990), maíz (Nitsch, *et al.* 1981),

trigo (Szakáés *et al.* 1988); lo mismo ha sucedido con muchas especies de la familia *Solanaceae* como *Nicotiana tabacum* (Sunderland y Wicks, 1969; Nitsch y Nitsch, 1970). Igualmente, en plantas ornamentales como *Saintpaulia ionantha*, *Anemone* sp., *Paeonia* sp., y en algunas plantas leñosas como el café y árboles frutales entre otras (Ascanio 1988; Zhang y Lespinasse, 1992).

Para la inducción de haploides por medio del cultivo de anteras deben considerarse los siguientes factores (Hu, 1985): 1) el genotipo de la planta donadora, 2) el estadio de desarrollo de las microesporas, 3) el medio de cultivo, 4) las condiciones preculturales y culturales de la planta.

2.1.1 Genotipo y Estado Fisiológico de la Planta Donadora.

El genotipo de la planta donadora, que incluye la especie, el cultivar y la línea o clon, juegan un papel determinante en la inducción de la androgénesis. Se ha podido constatar una respuesta diferencial entre especies y aún entre cultivares de una misma especie (Raghuramulu, 1989). Igualmente es importante notar que, en las Angiospermas, algunas especies tales como *Convolvulus* son totalmente recalcitrantes al proceso androgenético.

Nitsch (1981), indica que el éxito de la técnica de androgénesis radica en el estado fisiológico de la planta donadora al momento de la obtención de las anteras y en la aptitud y las condiciones necesarias para modificar el desarrollo normal del polen y llevarlo hacia una embriogénesis.

La respuesta de las microesporas está condicionada a muchas variables tales como el estado fisiológico de la

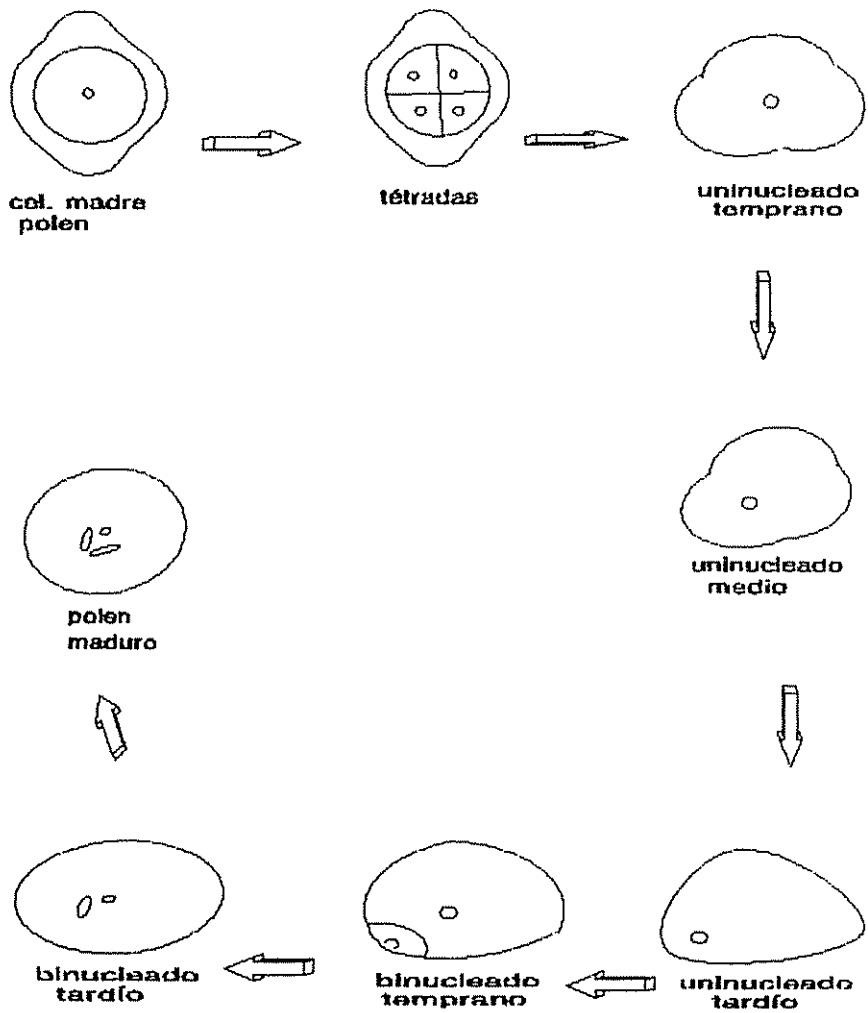
planta donadora al momento de la obtención de las anteras, aún cuando estas sean tomadas en su óptimo estado de desarrollo; se han reportado casos en que las variaciones estacionales han influido en las respuestas de las anteras sobre todo en especies de países templados. Tal es el caso de *Solanum tuberosum*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* entre otros. Estas variaciones estacionales están relacionadas con las condiciones ambientales: temperatura, fotoperíodo e intensidad de la luz, bajo las cuales se desarrolla la planta madre (Nitsch, 1981).

El porcentaje de inducción de haploides en arroz, así como en varias especies de *Nicotiana* y *Solanum*, presentan diferencias marcadas. De la misma forma, de 21 cultivares de *T. aestivum*, solo 10 de ellos desarrollan tejidos haploides. Estos estudios nos permiten constatar la necesidad de considerar varios cultivares cuando se quiera estudiar la técnica en una especie determinada (Ascanio, 1988).

2.1.2 Estadio de Desarrollo de las Microesporas

Gran cantidad de estudios han demostrado la importancia del estadio del desarrollo de la antera para la inducción del callo o embrión haploide. Sunderland (1979), reportó que las flores de muchas especies caen en una de las tres categorías: premitótica, mitótica o postmitótica. En la categoría premitótica se obtiene mejor respuesta al usar anteras en las cuales las microesporas han completado la meiosis, pero todavía no han iniciado la primera división mitótica del polen. Un ejemplo de esto lo tenemos en *C. arabica* variedad Garnica reportada por Ascanio (1987). En otras especies, las anteras pueden encontrarse en un estado postmitótico, tabaco, *Datura*, entre otras (Nitsch, 1972; Sunderland, 1979).

ESTADOS DE DESARROLLO DE LAS MICROESPORAS



2.1.3 Medio de Cultivo

Los requerimientos nutricionales para la inducción de callo o embriones haploides en general son simples. Sin embargo debe tenerse en cuenta que el medio de cultivo es el factor principal para la inducción y desarrollo de plántulas normales (Hu, 1985).

En *Nicotiana*, la embriogénesis puede ser inducida al colocar las anteras en un gel agar (Vasil, 1980) o sobre una solución de sacarosa al 2% con 0.8% de agar (Nitsch y Norrel, 1972).

En *D. innoxia*, la androgénesis puede ser inducida simplemente con colocar las anteras en una solución de sacarosa al 2% e incubadas a 25°C, cabe destacar que bajo estas condiciones se forma un pequeño número de embriones que solo se desarrollan hasta el estadio globular (Sunderland, 1974). La sacarosa y el hierro son los componentes más importantes del medio. Las sales minerales solo se necesitan a bajas concentraciones y algunos medios tales como el de Murashige y Skoog, se requieren a la mitad de su concentración (Murashige y Skoog, 1962). Otros medios basados en la formulación de White (1963), han sido probados en algunas especies (Bourgin y Nitsch, 1967).

Científicos chinos han creado un medio líquido Potato-II que posee un extracto de papa al 10%, sales de hierro y tiamina a las concentraciones utilizadas en el medio MS, y los macroelementos del medio de White. Encontraron que usando este medio se aumentaba la frecuencia en la inducción de callos en arroz y otros cereales en comparación con otros medios de cultivo (Hu, 1985).

Tanto en *Datura* como en *Nicotiana*, un medio simple con sales minerales y sacarosa, sin reguladores de crecimiento o

vitaminas, es suficiente para asegurar el desarrollo hasta el estado de plántulas (Nitsch y Nitsch, 1970).

Las concentraciones de sacarosa varían con la especie siendo más altas para las gramíneas y en el caso de *Hordeum spontaneum* el uso de maltosa benefició la regeneración de plantas (Piccirilli y Arcioni, 1991). La maltosa se hidrolisa más lentamente que la sacarosa y esta disponible por un tiempo más largo para las anteras. Además de ser metabolizados, el efecto de los azúcares es el de aumentar la presión osmótica del medio.

Los reguladores de crecimiento, en especial las auxinas y citoquininas, han sido usados en la inducción del desarrollo androgenético (Rajendra, *et al.* 1991; Wang, *et al.* 1974). Algunas auxinas como el 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), son sintéticas, otras como el ácido indolacético son naturales. Las citoquininas son derivados de adenina, siendo las más utilizadas la cinetina, la benziladenina, y la zeatina (Gamborg y Shyluk, 1981). El 2,4-D es la hormona más utilizada para las gramíneas. En cambio las citoquininas son más importantes para las dicotiledoneas.

En café se reporta el uso de las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) como base para el cultivo de anteras (Sondahl y Sharp, 1979; Ascanio, 1987).

2.1.4 Condiciones Preculturales y Culturales de la planta y del explante

Los haploides pueden ocurrir de forma espontánea o inducida experimentalmente por medio de traumas. Se ha observado que las anteras expuestas a un aumento o disminución de la temperatura, dependiendo de la especie, inducen la formación

de haploides ya que puede aumentar la capacidad androgenética de la antera (Bajaj, 1984).

La aplicación del choque térmico fue determinante en los procesos de callogénesis y embriogénesis de las anteras de *C. arabica* variedad Garnica (Ascanio, 1987). En este trabajo los embriones desarrollados después de haber aplicado el choque térmico presentaron un alto porcentaje de haploidía (70-80%). Aparentemente estos cambios de temperatura causan una disolución de los microtúbulos (Hepler Y Palevitz, 1974) y un cambio en la orientación del huso, que causa una división anormal de las microsporas, produciéndose dos núcleos iguales en lugar del núcleo generativo y el núcleo vegetativo que se forman normalmente después de la primera división mitótica del polen (Flores 1994). Esto trae como consecuencia un aumento en la viabilidad del polen y parece aumentar el número de granos de polen que están destinados a formar embriones (Bajaj, 1978).

Se ha encontrado que el uso del choque térmico en los botones florales es positivo en la mayor parte los cultivos con los cuales se ha utilizado la técnica de cultivo de anteras (Huang y Sunderland, 1982; Ascanio, 1987; Feng y Wolyn, 1991; Rajendra et al, 1991; Taylor y Veilleux, 1992; Mártensson y Widell, 1993).

Algunos autores han reportado logros positivos al colocar las anteras o granos de polen en soluciones de sacarosa por un determinado tiempo (Zhou, 1988), provocando un choque osmótico que contribuye a la multiplicación de células. En maíz se ha encontrado que es muy beneficioso el sumergir las microsporas en una solución de sacarosa al 25% durante 6 minutos (Kuo, 1982) siendo la concentración usual en el medio de cultivo entre 9 y 15%. En cebada se han obtenido beneficios utilizando manitol al 12% (Clapham,

1973), también se ha reportado para este cultivar, un incremento en el número de anteras con callos (17%) al aumentar las concentraciones de azúcar directamente al medio de cultivo (80 g/l de maltosa) (Piccirilli y Arcioni, 1991).

Sangwan-Norreel (1977), reporta que al someter las anteras a varios choques se incrementa aún más el número de anteras androgenéticas de *D. innoxia* Mill. Informa además que la aplicación de bajas temperaturas a los botones florales y la posterior centrifugación de los granos de polen favorecen la formación de embriones androgenéticos en comparación con el testigo. Ascanio (1987), encontró que en *C. arabica* variedad Garnica la centrifugación afectó positivamente la producción de callos pero no así el proceso de embriogénesis.

Existen otros pretratamientos que en algunos casos han resultado adecuados para la inducción de androgénesis; por ejemplo, la inmersión de los botones florales en agua durante un tiempo determinado, aumentó significativamente la respuesta androgenética de la antera (White, 1963; Piccirilli y Arcioni 1991).

Todos los pretratamientos se utilizan básicamente para provocar un estrés que induzca el cambio o desvío del gametofito masculino, hacia una ruta esporofítica y evitar de esta manera el desarrollo normal del grano de polen.

2.2 UTILIZACION DE HAPLOIDES EN FITOMEJORAMIENTO

Los haploides casi nunca se utilizan por sí mismos, a excepción de las plantas ornamentales, siempre son duplicados antes de ser utilizados. Los últimos avances en el cultivo de anteras ofrecen nuevas posibilidades para la aplicación de esta técnica en los programas de mejoramiento para la

obtención de híbridos comerciales o interespecíficos de gran valor. Utilizando este método se han podido regenerar plantas homocigotas en una generación dando acceso a nuevas formas recombinantes (Nitsch y Nitsch, 1970).

Dos tipos de haploides han sido descritos, los originados de especies diploides, llamados monohaploides y los originados de especies poliploides, llamados polihaploides, por ejemplo los haploides originados de *C. arabica* son llamados dihaploides porque la especie es tetraploide.

El alcanzar la homocigocidad de manera rápida, constituye una de las aplicaciones más importantes del cultivo de anteras en el desarrollo de nuevas variedades. Dado que la mayoría de las mutaciones son recesivas y se enmascaran en los individuos diploides, los haploides diploidizados por su condición homocigótica simplifican la selección de los caracteres controlados por estos genes (Collins, 1977).

El cultivo de células haploides permite seleccionar mutantes con sobreproducción de metabolitos, genotipos resistentes a herbicidas específicos, resistencia a presiones del medio ambiente o resistencia a antibióticos (Collins, 1977), ya que es posible obtener una planta completa a partir de un grupo de células y reproducirla con estas características (Acosta, 1981). Los beneficios de la disponibilidad de plantas haploides se extenderán a través de líneas homocigotas, a plantas que se autofecundan, plantas de polinización cruzada y plantas de propagación vegetativa (Acosta, 1981).

En plantas que se autofecundan es importante la selección por cruces, de líneas puras de alta calidad.

Después de una hibridación la restauración de la homocigocidad requiere de muchas generaciones (Cornide *et al.* 1985). Clapham (1977), señala que en cereales se requieren de cinco a siete generaciones de autofecundación o tres años para obtener un individuo homocigoto, tiempo que se reduciría a un año mediante la duplicación de los cromosomas de un haploide.

En plantas de polinización cruzada como *Coffea canephora*, que es fuertemente heterocigota y autoincompatible, las semillas híbrida provenientes de combinaciones biparentales conducen a poblaciones de gran diversidad genética, dando como resultado un producto heterogéneo. La necesidad de estas plantaciones clonales de genotipos intercompatibles, implica que estos híbridos tengan sincronización en la floración y los mismos requerimientos nutricionales (Forestier y Beley, 1969). A pesar de esto el producto final de estas plantaciones es heterogéneo.

Debido al ciclo de producción largo y la existencia de incompatibilidad, solamente la obtención de genotipos homocigotos permitirían la creación de híbridos genéticamente idénticos, con heterosis máxima, fácil divulgación y menos costoso. Podría pensarse en obtener estos individuos homocigotos a través de haploides diploidizados en un plazo aceptable (Dublin y Parvais, 1975).

El uso de haploides espontáneos para la obtención de dobles haploides (DH) nos brinda la oportunidad de desarrollar genotipos homocigotos completos. De hecho se ha logrado la obtención de 800 haploides naturales de *C. canephora* (Couturon, 1982; Berthaud *et al.*, 1987; Lashermes *et al.*, 1993).

Cacao, es una planta autoincompatible y de ciclo

vegetativo largo; la utilización de los haploides en el mejoramiento y estudio genético del cultivo es importante y necesaria, ya que la depuración genética por medio de los métodos clásicos de autofecundación y/o cruces de hermano(a)s, enfrenta dos dificultades: la autoincompatibilidad y ciclo vegetativo extenso (Dublin, 1978).

En China, con el empleo de esta técnica, se han obtenido variedades de arroz de alto rendimiento y con resistencia a razas virulentas locales de hongos, "blast". También han obtenido variedades con resistencia a la salinidad (Shen, *et al* 1983; Yadav *et al* 1991).

En el caso de mejoramiento de frutales los haploides serían de gran utilidad, ya que las cruces son difíciles de llevar a cabo por los ciclos largos, por la naturaleza altamente heterocigótica de la mayoría de los frutales y por factores como la partenocarpia (Rajasekavan y Mullins 1979).

2.3 HAPLOMETODOS EN CAFE

Monaco *et al* (1977), reportan cuatro especies del género *Coffea*, en las que se ha intentado la producción de plantas haploides, estas son: *C. arabica*, en la que se logró la formación de proembriones en callos provenientes de anteras y un crecimiento pobre en granos de polen aislado, *C. liberica*, donde hubo buen crecimiento de callos pero sin lograr la embriogénesis, *C. racemosa*, donde casi no hubo crecimiento a partir de anteras y *C. canephora* donde se reportó un crecimiento pobre. El híbrido interespecífico, llamado Arabusta, producto del cruce entre *C. arabica* y *C. canephora* presentó poca proliferación de callo, cuando se sembraron sus anteras.

Monaco *et al.* (1977) y Sondahl *et al.* (1991), reportan que el medio utilizado en las especies antes mencionadas, estuvo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog, sacarosa (40 g/L), mio inositol (100 mg/L), tiamina-HCl (4 mg/L), además de L-Cisteína-HCl (10 mg/L), Cinetina (.1 mg/L), 2,4-D (.1mg/L), Agar (.8 g/L) y un PH de 5.8.

Estos autores manifiestan que al sembrar las anteras en el medio y en la oscuridad a una temperatura $\pm 25^{\circ}$ C, se observó la proliferación de callo con complemento cromosómico di-haploide ($2x=22$), en la especie *C. arabica*, observándose además algunas líneas celulares con complemento cromosómico haploide ($x=11$).

En el cultivo de microesporas aisladas, utilizando el mismo medio, no se lograron resultados positivos, informándose que de 100 cultivares solo uno mostró proliferación de células.

El cultivo de anteras aplicando pretratamiento de frío en tres especies diferentes de café entre la que se encontraba *C. arabica* y luego de una permanencia a temperatura ambiente durante cuatro días observó una etapa de desarrollo precoz de los microsporos y la etapa de primera división polínica. En estas etapas, se han obtenido estructuras con varios núcleos, algunas de las cuales tenían un núcleo reproductor y hasta nueve vegetativos (Lanaud y Parvais, 1980).

Ascanio (1987), reporta la obtención de un alto porcentaje de embriones haploides, utilizando como pretratamiento el choque térmico y un medio caracterizado por el ácido naftalinacético (ANA).

Carneiro (1993), reporta la inducción de embriones

somáticos y regeneración de plantas en las variedades Catuai y Catimor de *C. arabica*, mediante el cultivo de microesporas aisladas y anteras completas.

Neuenschwander et al (1993), lograron inducir la proliferación de colonias celulares haploides a partir de microesporas aislados mecánicamente.

El proceso de embriogénesis somática en óvulos de *C. canephora* y la regeneración de plantas fue iniciado por Lanaud (1981). Todas las plantas obtenidas fueron diploides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue establecido en la Unidad de Biotecnología del CATIE, ubicada en Turrialba, Costa Rica. La fase de laboratorio empezó en Febrero de 1994, ya que la floración mayor ocurre generalmente en los meses de Enero a Mayo. Se colectaron muestras de tres introducciones procedentes del Banco de Café, localizado en Cabiria - CATIE, a una altura de 602 metros sobre el nivel del mar, y una temperatura promedio de 23°C para los meses de febrero a mayo de 1994.

3.1. Material Vegetal

INTRODUCCIONES	Nº DE ACCESIÓN DEL CATIE	Nº CROMOSÓMICO
Caturra	T-2308	2n=4x=44
Garnica (Mundo Novo x Caturra)	T-12855	2n=4x=44
Colombia (Catimor)	T-8927	2n=4x=44

Garnica y Colombia son cultivares homocigotos que no son producto directo del cruce Mundo novo x Caturra ni de Catuai x Híbrido de Timor respectivamente, sino que fueron seleccionados por cinco generaciones mediante autofecundaciones. Caturra es un mutante enano de Borbón.

3.2. Explante a cultivar

De cada uno de los cultivares, se colectaron botones florales en diferentes estados de desarrollo, se sembraron las anteras en platos Petri de 60 x 15 mm y se platearon cinco anteras por plato. El estudio comprendió cuatro fases principalmente:

3.3. Fase I: Características fenológicas del botón floral en relación al estadio de desarrollo de las microesporas.

Se estableció para cada genotipo su correspondencia entre el estado de desarrollo del botón floral y el desarrollo de las microesporas (pre mitótico, mitótico o post mitótico). Para ello se midió, con ayuda del papel milimétrico, el largo y se estimó el ancho de los botones florales de cada una de las introducciones en estudio. Se observó el color del botón relacionandolo con el estado de madurez de las microesporas. Una vez realizadas las mediciones, se extrajeron las anteras, las cuales se colocaron sobre un portaobjeto y se maceraron con ayuda de una barrita de vidrio (policía). Los residuos más grandes fueron eliminados y el material más pequeño fue teñido con acetocarmín al 3% (Anexo 4b).

Para esta fase se examinaron tres botones florales por introducción lo que hace un total de quince anteras por cultivar. Seguidamente se procedió al estudio de las microesporas, con ayuda de un microscopio de luz, se realizaron los conteos de las microesporas en fase de células madres de las esporas, tétradas, uninucleados, binucleados y granos de polen maduro.

3.4 Fase II: Cultivo de anteras

3.4.1 Desinfección

Se probaron cuatro métodos de desinfección, para lo cual, los botones florales de las tres introducciones, fueron colocados previamente de dos a tres minutos en agua destilada con tres gotas de tween-80, luego fueron enjuagados dos veces con agua destilada y colocados en alcohol al 70%

por un minuto y se enjuagaron con agua destilada estéril, dentro de la cámara de flujo laminar. Inmediatamente después, se procedió a probar cada uno de los métodos de desinfección que se describen a continuación:

- A) - Hipoclorito de calcio al 1% por 25 minutos.
 - Enjuagar con agua bidestilada estéril. 3 veces.
 - Sumergir en una solución estéril de L-cysteina
 HCL (10 mg/l), (Mónaco, et al. 1977).
- B) - HgCl₂ al 0.1% por 4 minutos.
 - Sumergir en L-cysteina al 0.1% por 10-15
 minutos.
 - Enjuagar con agua estéril 4-5 veces,
 (Raghuramulu 1989).
- C) - Hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
 - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.
 - Colocar en una solución de L-cisteína estéril
 (50mg/L) (Dufour, com. personal).
- D) - Hipoclorito de Calcio al 25% por 5 minutos.
 - Enjuagar 4 veces con agua destilada estéril.
 - Se colocaron en una solución con cisteína
 (50mg/l) y Benomil (500 mg/l), (Ascanio 1987).

Todas las anteras una vez desinfectadas fueron sembradas en platos Petri (60 x 15mm), conteniendo el medio Ascanio I (Anexo 1b), se sembraron cinco anteras por plato. Se utilizaron treinta anteras por repetición, y cada desinfección tenía tres repeticiones por introducción. Lo que hace un total de 90 anteras por introducción y por tratamiento.

La siembra de las anteras se realizó en la cámara de flujo laminar, flameando todo el material que se usó para la disección de las mismas. Es importante señalar que, al efectuar la disección, se utilizó pinzas especiales de microscopia electrónica, debido al pequeño tamaño de las anteras. Se procedió a realizar una incisión horizontal sobre la antera, se separan los pétalos que las envuelven y se toman con mucho cuidado ya que pueden ser fácilmente dañadas. Debe sacarse el filamento entero, para ello debe cortarse desde la base donde está adherido.

3.5. Fase III: Pre Tratamientos o Métodos Preculturales.

Una vez logrado el método más adecuado de desinfección se evaluaron los siguientes pretratamientos:

3.5.1 Choque Térmico:

Los botones florales fueron sometidos a dos regímenes de temperatura (5°C y 28°C) para tratar de inducir cambio(s) androgénico(s). Los tiempos de exposición a estas temperaturas fueron de dos, cuatro y ocho días; también se utilizó un control, donde las anteras traídas del campo, fueron sembradas directamente en el medio de cultivo y no fueron expuestas a ninguna variación de temperatura. De esta forma quedaron conformados siete pretratamientos con tres repeticiones para cada cultivar. Cada repetición estuvo constituida por treinta anteras haciendo un total de 90 anteras por pretratamiento.

- T1 Control (sin choque térmico).
- T2 5°C por 2 días.
- T3 5°C por 4 días.
- T4 5°C por 8 días.
- T5 28°C por 2 días.

T6 28°C por 4 días.

T7 28°C por 8 días.

Este pretratamiento se efectuó a los tres cultivares en estudio. Las anteras así tratadas fueron sembradas en el medio simple de Murashige y Skoog (MS) (Anexo 1a) y medio de Gamborg (B-5) (Anexo 2a). Los pretratamientos fueron evaluados a los 15 y 30 días por medio de observaciones morfológicas y estudios histológicos. Aquellas anteras que dieron respuestas fueron pasadas al medio de Yasuda (Anexo 2b) y Pierson (Anexo 1b) y colocadas en la oscuridad.

3.5.2 Choque Térmico y Centrifugación

Los botones florales fueron sometidos a un choque térmico de 5° C durante dos tiempos de exposición: dos y cuatro días y a tres tiempos de centrifugación (3,000 rpm en una centrífuga refrigerada), durante veinte, cuarenta y sesenta minutos. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento, lo que hace un total de noventa anteras para cada introducción y cada tratamiento. A continuación, se detallan los pretratamiento aplicados a los botones florales de cada una de las introducciones:

T1 Centrifugación por 20 minutos.

T2 Centrifugación por 40 minutos.

T3 Centrifugación por 60 minutos.

T4 5 °C por 2 días + centrifugación por 20 minutos.

T5 5 °C por 2 días + centrifugación por 40 minutos.

T6 5 °C por 2 días + centrifugación por 60 minutos.

T7 5 °C por 4 días + centrifugación por 20 minutos.

T8 5 °C por 4 días + centrifugación por 40 minutos.

T9 5 °C por 4 días + centrifugación por 60 minutos.

T10 Sin tratamiento térmico ni centrifugación.

Todos los tratamientos antes descritos fueron sembrados en el medio simple de Murashige y Skoog (MS) (Anexo 1a) y el medio de Gamborg (B-5) (Anexo 2a), y colocados en la oscuridad a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las evaluaciones se realizaron por medio de observaciones morfológicas e histológicas a los 15 y 30 días.

3.5.3 Choque osmótico

Para este caso, se colocaron treinta anteras en dos concentraciones de sacarosa: 20% y 40% como se describe a continuación.

T1 Sacarosa 20% por 1 hora.

T2 Sacarosa 40% por 1 hora.

T3 Sin control osmótico.

Al igual que en los casos anteriores los explantes después de tratados fueron sembrados en el medio de Murashige y Skoog (MS) y B-5 (Anexo 1a y 2a) para su evaluación morfológica e histológica. La evaluación se realizó a los 15 días después de sembrados.

3.6 Fase IV: Medios de Cultivo.

3.6.1 Inducción de Callos.

El medio más utilizado en café para cultivo de anteras es el de Murashige y Skoog el cual se utilizó con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas. También se probó el medio de Gamborg (B-5), al cual se le añadieron diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas (Cuadro 1).

Cuadro # 1

Medios de Cultivo		Auxinas (mg/l)	Citoquininas (mg/l)	
MS	B-5	2,4-D	AIB	CINETINA
M1		2.0		1.0
M2		2.0		0.5
M3		4.0		1.0
M4		4.0		0.5
	M5		1.0	0.5
	M6		1.0	1.0
	M7		2.0	0.5
	MB		2.0	1.0

Para la realización de esta fase se utilizaron todas aquellas anteras que no dieron respuestas con los medios de cultivo simples, los cuales no contenían ningún tipo de hormonas.

3.6.2. Inducción de embriones.

Una vez observado el crecimiento del callo, se utilizaron los siguientes medios para tratar de inducir el desarrollo de embriones:

a. Medio de Yasuda, (Anexo 5) el cual contiene además de los macro y micro elementos de Yasuda, FeEDTA (5mg/l), Tiamina (10mg/l), Inositol (100mg/l), Piridoxina (1mg/l), Ac. nicotínico (1mg/l), Bencil amino purina (1.12mg/l), FeSO₄.7H₂O (5.57g/l)+ Na₂EDTA (7.4g/l), Sacarosa (30g/l), Gelrite (2g/l), y pH ajustado en 5,6.

b. Medio de Pierson, (Anexo 6), el cual está compuesto por los macro y micro elementos de MS/2, Tiamina (10mg/l), solución madre de FeEDTA (anexo), Cisteína (50mg/l), Mioinositol (100mg/l), Caseína hidrolizada (100mg/l), 2-iP (1mg/l), AIB (5mg/l), sacarosa (30g/l), gelrite (2g/l) y pH ajustado a 5,6.

3.6.3. Condiciones del Cultivo

- Los Tratamientos sembrados en los medios Ascanio I, MS, B-5, Pierson y Yasuda se colocaron en la cámara de crecimiento en completa oscuridad a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.7. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Los estudios histológicos para todas los estudios se llevaron a cabo en el laboratorio de Histología en la Unidad de Biotecnología. Las muestras para fueron fijadas en FAA y otras en glutaraldehído (Anexo 3b) por 48 horas y 12 horas respectivamente. Luego fueron sometidas a un proceso de deshidratación en una serie ascendente de alcohol (Anexo 5a), para resina hasta alcohol absoluto, siendo luego incluidas en parafina e historesina y posteriormente se realizaron cortes de los bloques, de 8 y 3 micras de espesor con un microtomo de rotación y de resina respectivamente. Las muestras fueron teñidas con la técnica de Cuadruple coloración (Anexo 4d) y observadas al microscopio de luz para su evaluación.

3.8. VARIABLES A MEDIR

3.8.1 Fase I:

- Conteo de microesporas en estado de células madres del polen, tétradas, uninucleado, mitótico, binucleado y granos de polen maduros.

3.8.2 Fase II:

- Porcentaje de anteras contaminadas y no contaminadas.

- Porcentaje de anteras parcialmente oxidadas.
- Porcentaje de anteras totalmente oxidadas.
- Porcentaje de anteras no oxidadas.
- Porcentaje de microesporas viables. Para esta variable se tomaron muestras al azar.
- Porcentaje de anteras con callos.

3.8.3 Fase III:

- Porcentaje de anteras que sobreviven.
- Porcentaje de microesporas en división.
- Porcentaje de anteras que produjeron callos al tiempo n.

3.8.4 Fase IV:

- Porcentaje de callos que produjeron embriones.
- Número de callos que aumentaron su tamaño o mostraron crecimiento.

3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los ensayos fueron evaluados de manera independiente y los tratamientos se dispusieron en un diseño Completo al Azar con arreglo factorial. También se utilizó un análisis de medias ajustadas (Steel y Torrie, 1985).

Para determinar si existen diferencias entre los tratamientos se procedió a realizar un análisis de varianza. Además, se aplicó la prueba de Duncan y Tukey's, entre aquellas variables que fueron significativas. Se realizaron transformaciones arco seno en los datos de la fase II y III y raíz cuadrada en la fase IV.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Estado de desarrollo de las anteras

En general, para las tres introducciones, Garnica, Caturra y Colombia, los botones florales de seis milímetros presentaron una coloración verde intensa, los de siete a nueve milímetros presentaron una coloración verde amarillenta, mientras que los botones florales de diez milímetros y más, eran de color blanco crema (Fig. 1). El tamaño máximo de los botones, antes de la apertura es de 18 mm aproximadamente.

En la mayoría de las especies, así como en café (Ascanio 1987), el estadio de desarrollo del grano de polen exitoso para la obtención de haploides, es el estadio uninucleado. Sin embargo, la observación microscópica de cada antera no es factible y es necesario tener un método simple de reconocimiento que nos permita conocer el estado de desarrollo, basado en marcadores fenológicos tales como el color y/o el tamaño del botón floral. Lakshmana *et al* (1987), realizaron un estudio en *Feltophorum pterocarpum*, para correlacionar factores morfológicos del botón floral con el estado de desarrollo de la antera, y encontraron que el cambio progresivo del color de la antera era un buen indicador de su madurez. En nuestro caso el poder relacionar el color con el tamaño del botón floral de nuestro interés, nos permitió coleccionar en el campo el material adecuado con mayor seguridad.

De acuerdo a las observaciones realizadas al microscopio de luz, se puede apreciar que la microesporogénesis se desarrolla con una secuencia de eventos; se nota primero la presencia de microesporocitos, los cuales por meiosis dan origen a las tétradas. Ellas se

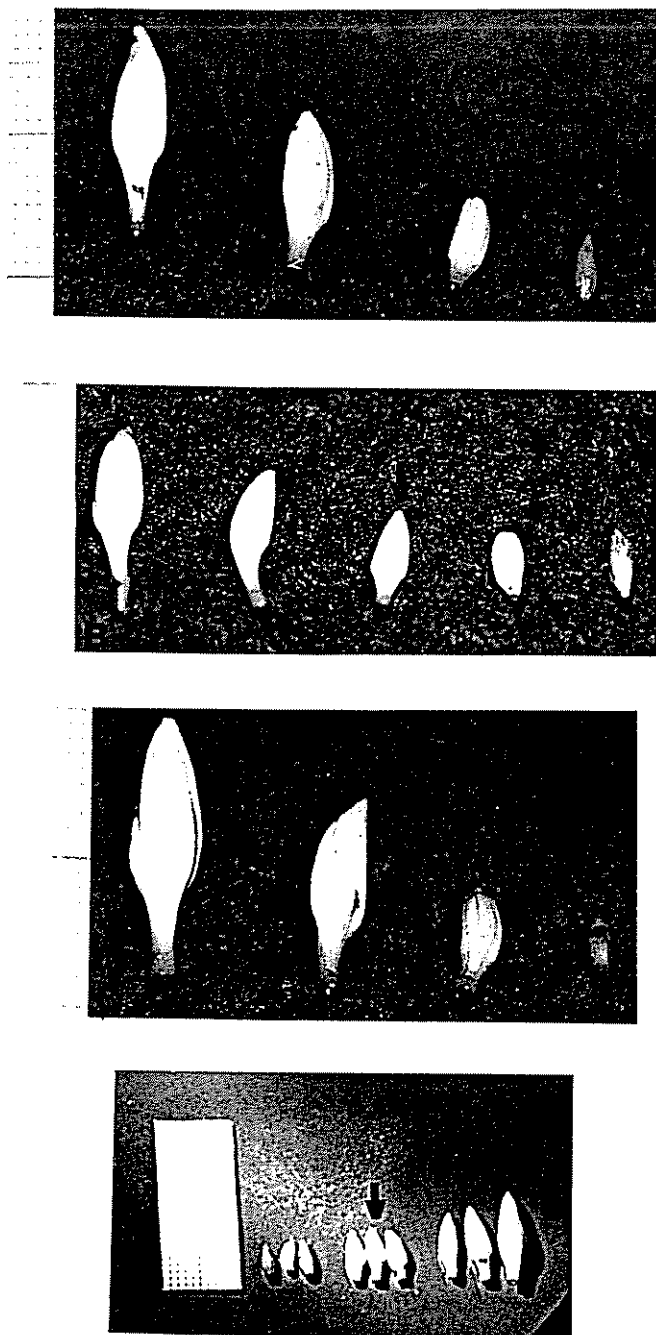


Fig. 1 Tamaño de los botones florales para cada una de las introducciones. A. Garnica; B. Caturra; C. Colombia
D. Aspectos generales del tamaño del botón seleccionado
Las flechas indican el tamaño del botón utilizado.

caracterizan por la presencia de cuatro microesporas con su respectiva pared, agregadas en forma de tetraedro y encerradas dentro de una pared especial, constituida de calosa (Fig. 2A y 2B). Seguidamente, se observan microesporas que recién acaban de ser liberadas de la pared de calosa, por la acción de una enzima especial, la calasa y que se caracterizan por una delgada capa de exina. En este estado, la microespora es esférica y se aprecia el núcleo en posición central, el citoplasma es denso (Fig.2C). Luego la capa de exina se vé mas gruesa (está formada por compuestos liberados por el tapete), la microespora adquiere una polaridad: el núcleo se coloca a un extremo de la célula y pequeñas vacuolas se agrupan al extremo opuesto. Este estadio precede la mitosis polínica.

Estados más avanzados en el desarrollo de la microespora, muestran una célula binucleada, donde uno de los núcleos es grande (vegetativo) y el otro es pequeño (generativo), ubicado más cerca de la pared (Fig. 2D); es el "estado binucleado", en el cual las dos células son realmente distintas. Finalmente, se observan granos de polen con una capa de exina gruesa y ornamentada que imposibilita la observación de su estructura interna al microscopio de luz. Aquí es importante mencionar que los diferentes colorantes utilizados no lograron penetrar la pared y lo único que se coloreó fue la ornamentación de la misma y muy levemente el citoplasma. Para evitar este fenómeno, se puede dejar el material en un fijador histológico antes de colorearlo.

Trabajos realizados por Ascanio (1987), permitieron determinar que el estado adecuado para inducir la androgénesis en café, es cuando la microespora se encuentra en estado uninucleado, ya que las microesporas en ésta etapa, presentan una pared celular relativamente delgada lo

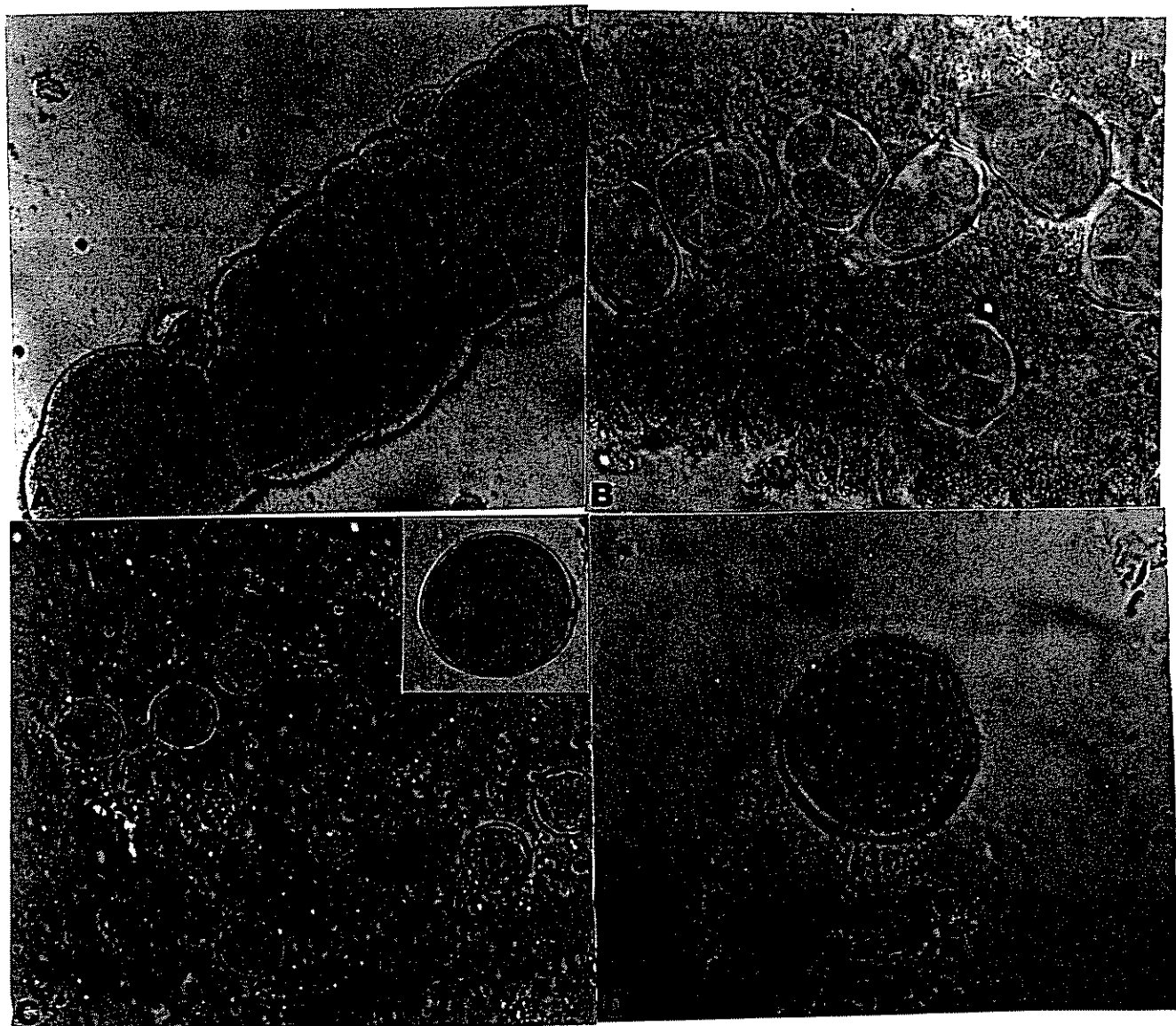


Fig. 2 Estados de desarrollo de las microesporas.
A. Microesporocitos (20x); B. Tétradas (20x); C. Estado Uninucleado (20x), recuadro núcleo y nucleolo (40x); D. Estado Binucleado (20x por 1.6x).

cual las hace más receptivas a estímulos externos. Roca et al (1991), sostienen que la razón principal para preferir el estado uninucleado, es que el núcleo se encuentra en el estado ideal para responder al estrés aplicado.

Cuadro 1. Porcentaje de microesporas de café, en los diferentes estados de desarrollo, para las tres introducciones en estudio.

Tamaño/mm. Cultivar	Cél. Madres (%)	Tétradas (%)	Uninucleado (%)	Binucleado (%)	P.Maduro (%)
Colombia					
6	93.8	1.5	4.7	0	0
7	38.5	0.5	60.9	0.6	0
8	0	0.2	98.8	0.9	0
9	0	0	91.2	1.6	7.2
10	0	0	30.5	4.2	65.3
Caturra					
6	18	5.2	73.5	3.3	0
7	0	1.9	94.1	1.8	2.2
8	0	1.2	12.1	0	43.7
9	0	0	36.8	1.0	62.1
Garnica					
6	96.6	0.9	2.5	0	0
7	15.1	34.4	39.3	0	6.2
8	0	0.2	80.5	0.1	19.2
9	0	0	12.6	0	87.4

En el cuadro 1 se observa que el número de tétradas encontrado fue mucho menor que el de estado uninucleado. Debido a que éstos estados son de corta duración y por lo tanto difíciles de observar, es posible que la hora del día a la cual se realiza la recolección del material esté relacionada con el mayor o menor porcentaje de estados encontrados. Además, se pudo notar que para una misma longitud de anteras, algunas se presentaban más aplanadas, indicando así un estado más inmaduro.

En el desarrollo de las microesporas, se observó, en los tres cultivares, la presencia de diferentes estados, aún en un mismo botón floral y, frecuentemente, dentro de una

misma antera, lo que complica el poder correlacionar el tamaño del botón floral con un determinado estado de desarrollo de las microesporas. Eso implica que en botones florales de seis a nueve milímetros podemos encontrar microesporocitos, tétradas, microesporas en estado uninucleado y/o binucleado y granos de polen maduro. Sin embargo, lo que varía es el porcentaje de cada una de estas fases en el botón floral (Cuadro 1). Esto coincide con los resultados de Raghavan (1978), quién trabajando con *Hyoscyamus niger* (Hebano), encontró que la proporción de anteras eficientes o productivas variaba entre las anteras de botones florales de una misma edad y aún entre anteras del mismo botón floral.

Como resultado de este estudio, se tomaron botones florales en los cuales las microesporas estuviesen en mayor porcentaje en estado uninucleado: para Garnica botones de 8mm, Caturra de 7mm y para Colombia de 8 y 9 mm. (Fig. 3).

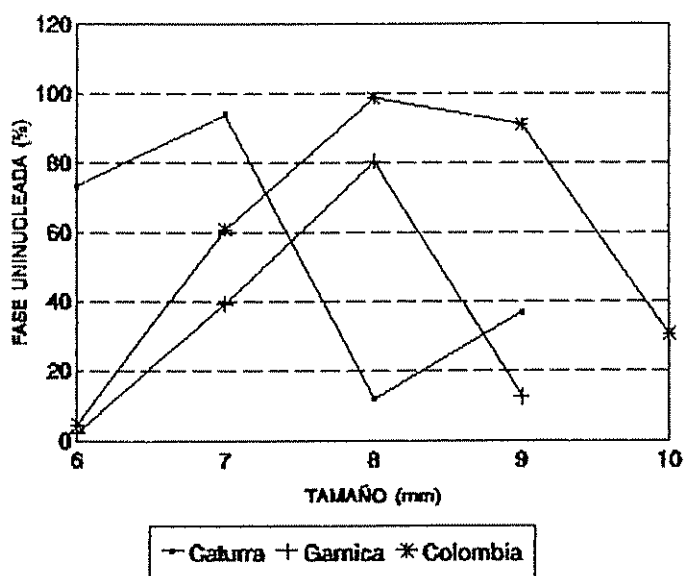


Figura 3. Porcentaje de microesporas en estado uninucleado en tres introducciones de *Coffea arabica*. CATIE, Costa Rica.

Diferentes autores, trabajando con cultivos como arroz, repollo, espárrago, frutales y otros, coinciden en que la fase uninucleada tardía (núcleo parietal), es la más recomendable para la inducción de la androgénesis (Chauvin, et al. 1993; Feng y Wolyn, 1991; Chen, 1977). En estudios realizados en papa, el tamaño del botón floral escogido fue aquel donde las microesporas estaban en fase uninucleada o de tétradas (4-6mm) (Tiainen, 1992). En nuestro caso, el estado uninucleado es el que nos interesa.

4.2 METODOS DE DESINFECCION

Los cuatro métodos de desinfección propuestos inicialmente (A,B,C,D), se encuentran básicamente compuestos por:

- A. Hipoclorito de calcio al 1% por quince minutos.
- B. Cloruro de mercurio al 0.1% por cuatro minutos.
- C. Hipoclorito de calcio al 8% por quince minutos.
- D. Hipoclorito de calcio al 25% por cinco minutos.

El hipoclorito de calcio se le considera como un buen desinfectante, y resulta menos tóxico para el material que el hipoclorito de sodio, ya que se acumulan menos residuos sobre el material.

El cloruro de mercurio, es un reactivo de alto riesgo, clasificado como cancerígeno, su uso debe ser limitado y es necesario el uso de guantes de hule para su manipulación.

El método A se descartó debido a que en las pruebas preliminares las anteras no respondieron a esta desinfección, encontrándose hasta un 95% de contaminación de los materiales.

4.2.1 Evaluación a los siete y quince días.

4.2.1 Contaminación

El método de desinfección que dió mejor resultado fue el C, donde los cultivares Colombia y Garnica presentaron los niveles más altos de anteras no contaminadas en ambas fechas de evaluación.

El análisis de varianza aplicado a los métodos de desinfección permitió detectar diferencias significativas, entre cada una de las desinfecciones del cultivar Garnica. Para el cultivar Colombia, no hubo diferencias entre las desinfecciones D y B pero sí entre estas dos con la desinfección C. Durante la segunda evaluación la desinfección C se confirmó como el mejor método para ambos cultivares (Cuadro 2; Fig.4).

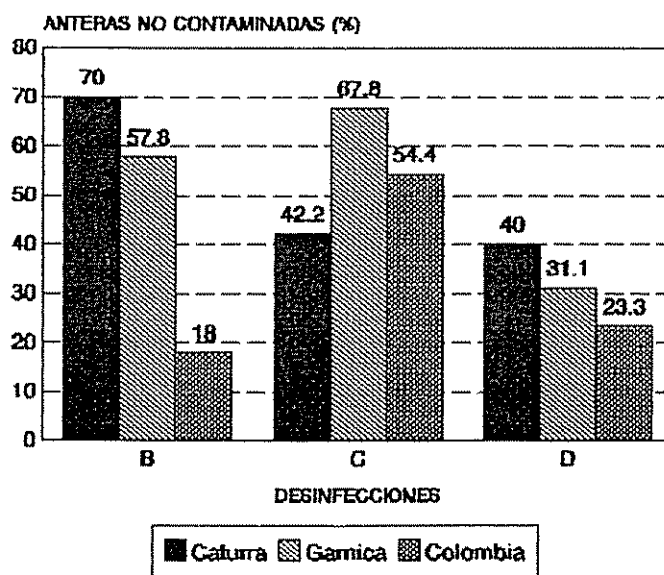


Fig. 4 Métodos de desinfección aplicados a tres cultivares de café, para la variable anteras no contaminadas. Evaluación a los siete días.

En el caso del cultivar Caturra, no existieron

diferencias significativas ($Pr > 0.1769$), entre los métodos de desinfección por el número de anteras no contaminadas (Figura 4). Los tres métodos de desinfección B, C y D muestran un comportamiento similar, manteniéndose la tendencia observada durante la primera evaluación.

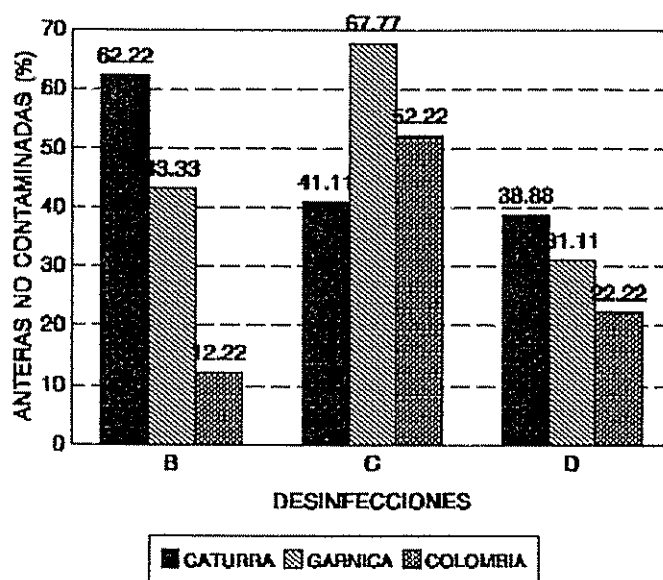


Fig. 5 Métodos de desinfección aplicados a tres cultivares de café, para la variable anteras no contaminadas. Evaluación a los 15 días.

Cuadro 2. Porcentaje de anteras no contaminadas en cada método de desinfección por introducción. Evaluación a los 7 días.

	Métodos de Desinfección		
	B	C	D
Colombia $Pr > 0.02938$	17.8	54.4	23.2
Caturra $Pr > 0.0952$	70	42.2	40
Garnica $Pr > 0.004188$	57.7	67.8	31.1

La evaluación realizada quince días después de la siembra del material, permitió establecer que hubo un pequeño aumento en la contaminación, con respecto a la evaluación efectuada a los siete días. La contaminación se debió a bacterias y sobre todo a hongos, que rápidamente contaminaron el resto del material.

4.2.1.2 Oxidación

Es importante mencionar que los tres métodos de desinfección causaron la oxidación parcial o total de algunas de las anteras de los diferentes materiales utilizados. Así, el método D fue el que presentó los porcentajes más altos de oxidación, mientras que el C dió los porcentajes más altos de anteras no oxidadas (Cuadro 3). Esta apreciación es válida para ambas evaluaciones.

Cuadro 3. Porcentaje de anteras no oxidadas para cada desinfección por introducción.

Desinfecciones	INTRODUCCIONES		
	Caturra	Garnica	Colombia
B	12.0	6.0	0.8
C	34.0	12.0	2.2
D	0.8	0.8	0.0

Este fenómeno fue reportado por Ascanio y Arcia (1994), quien observó que las anteras que no mostraron respuestas de crecimiento se oxidaron posteriormente al inicio del cultivo.

La oxidación pudo ser una respuesta del material a los reactivos químicos utilizados en la desinfección, influyendo el tiempo de exposición y/o la concentración de los mismos. También pudo ser producto de la manipulación previa a la

siembra ya que las anteras tienden a oxidarse al contacto con las pinzas de acero. El cafeto posee una alta concentración de compuestos fenólicos los cuales se oxidan y producen acumulación de quinonas, que dá a las anteras una coloración marrón (Sondhal y Sharp 1979).

El análisis histológico por el método de maceración de las anteras oxidadas o parcialmente oxidadas de los tres cultivares, permitió la observación de un número reducido de microesporas. Las microesporas posiblemente pasaron por un estado de descomposición normal antes de la evaluación, por lo que cada vez que se hicieron los macerados, éstas prácticamente no se observaron. La desinfección también pudo haber influido en el deterioro de algunas microesporas. En los cortes histológicos, lo único que fue posible observar fueron las paredes de la antera, en un estado avanzado de deterioro y muy pocas megaesporas en buen estado.

4.2.1.3 Formación de Callos

La evaluación del comportamiento de las anteras de los diferentes cultivares, permitió observar el desarrollo de callos en anteras no oxidadas y parcialmente oxidadas. Al igual que sucedió con las variables medidas anteriormente, el tratamiento C fue el que produjo el mayor número de anteras con callos (Fig.6). Esto puede ser explicado como un efecto no dañino del hipoclorito de calcio a los tejidos de la antera cuando se usa al 8% por 15 minutos. La desinfección D, que corresponde al hipoclorito de calcio al 25% por cinco minutos, produjo cantidades intermedias de anteras con callos comparado con los tratamientos B y C. Esto pudo ser causado por la alta concentración del hipoclorito de calcio (tres veces mayor que en el tratamiento C) y no por el tiempo de exposición.

En general al utilizar la desinfección B se obtuvieron los menores porcentajes de formación de callos para los tres cultivares, debido tal vez a la toxicidad que presenta el cloruro de mercurio para los tejidos vegetales.

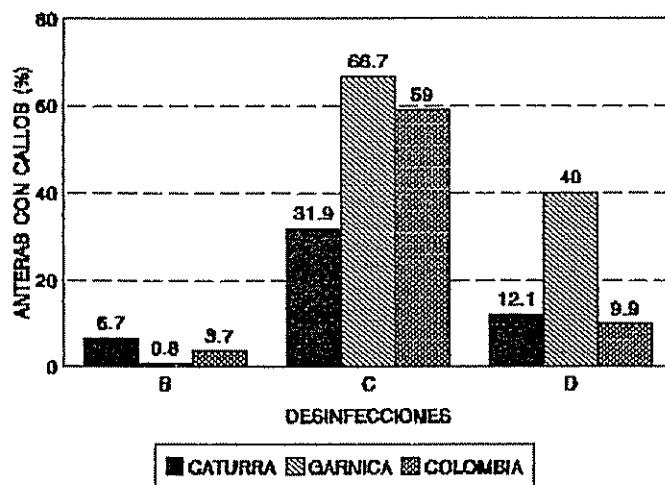


Fig. 6 Evaluación de tres métodos de desinfección utilizando la variable número de callos en tres cultivares de café. Evaluación 7 días.

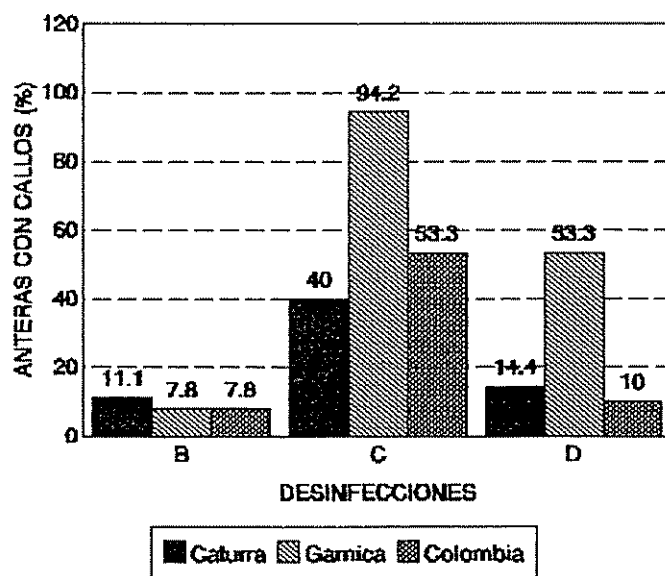


Fig. 7 Comparación de tres métodos de desinfección mediante la variable producción de callos en tres cultivares de café. Evaluación a los 15 días

En Caturra y Colombia las desinfecciones B y D se comportaron de manera similar, mostrando diferencias únicamente con la desinfección C, donde se obtuvieron los mejores resultados. Esto fue corroborado por el análisis estadístico que mostró que para estos cultivares hubo diferencias significativas y altamente significativas en la formación de callos.

El cultivar Garnica, fue el único que mostró diferencias, en cuanto a la producción de callos para los tres tratamientos de desinfección. Este cultivar reaccionó mejor con la desinfección C; sin embargo, exhibió diferencias entre los tratamientos B y D contrario a lo que sucedió con los otros cultivares para los cuales no hubo diferencias entre estas desinfecciones (Fig. 6 y 7).

Garnica y Colombia, fueron los cultivares que dieron respuestas más satisfactorias en cuanto a la formación de callos, utilizando el método C de desinfección (Cuadro 4).

En el caso del cultivar Caturra, la producción de callo fue muy parecida para las tres desinfecciones; el análisis estadístico señaló que no hubo diferencias significativas

Cuadro 4. Porcentaje de callos producidos, mediante el uso de tres métodos de desinfección, evaluados a los siete y quince días.

Total de Anteras 90+	B		C		D	
	7 Días %	15 Días %	7 Días %	15 Días %	7 Días %	15 Días %
Colombia Pr>0.0009** Pr>0.0117*	5.6	7.8	41.1	53.3	10.1	10.1
Caturra Pr>0.0114* Pr>0.4118	7.8	11.1	31.1	40.0	12.2	14.4
Garnica Pr>0.0001** Pr>0.0013**	2.2	7.8	50.00	94.2	40.0	45.6

*Total en Garnica 120 anteras.

entre las desinfecciones en la segunda evaluación. Se puede observar que a pesar de esta similitud, la tendencia apunta hacia la desinfección C (Fig.7).

Los callos, en los tres métodos de desinfección, se desarrollaron en algunos casos directamente de la pared de la antera, en otros en la base de la cicatriz del filameto o bien a partir del interior de la antera (Fig.8). En este último caso, los lóculos de la antera se abrieron dando paso a la formación del callo y dejando expuestos los granos de polen, algunos de los cuales se desprendieron y quedaron en contacto directo con el medio de cultivo; lo que fue más evidente en anteras del cultivar Garnica. El callo era de color blanco-crema, de apariencia friable y por su aspecto inicial parecía ser embriogénico. Este tipo de callo fue detectado después de 12 semanas, esto coincide con los resultados encontrados por Ascanio (1987). Estos callos se transfirieron a los medios de Pierson y Yasuda; sin embargo, no se observó ningún cambio en ellos. Esto pudo haber ocurrido por un agotamiento del medio y/o una pérdida de la capacidad embriogénica, antes de realizarse el cambio de medio. Una vez cambiados a medio de Pierson y Yasuda los callos no mostraron mayor desarrollo. En el medio de Yasuda algunos callos adquirieron una coloración marrón claro, después de cinco a seis semanas de cultivo.

Las características observadas en los callos de café concuerdan con las descripciones realizadas por Mahewaran y Williams (1985), quienes afirman que los callos embriogénicos de cualquier especie poseen características comunes, como la rápida división, células pequeñas, contenido citoplasmático denso, núcleo grande con nucleolos prominentes y muchos granos de almidón. En café, el callo embriogénico presenta una coloración amarillo pálido, apariencia friable, sus células son tipo meristemáticas,

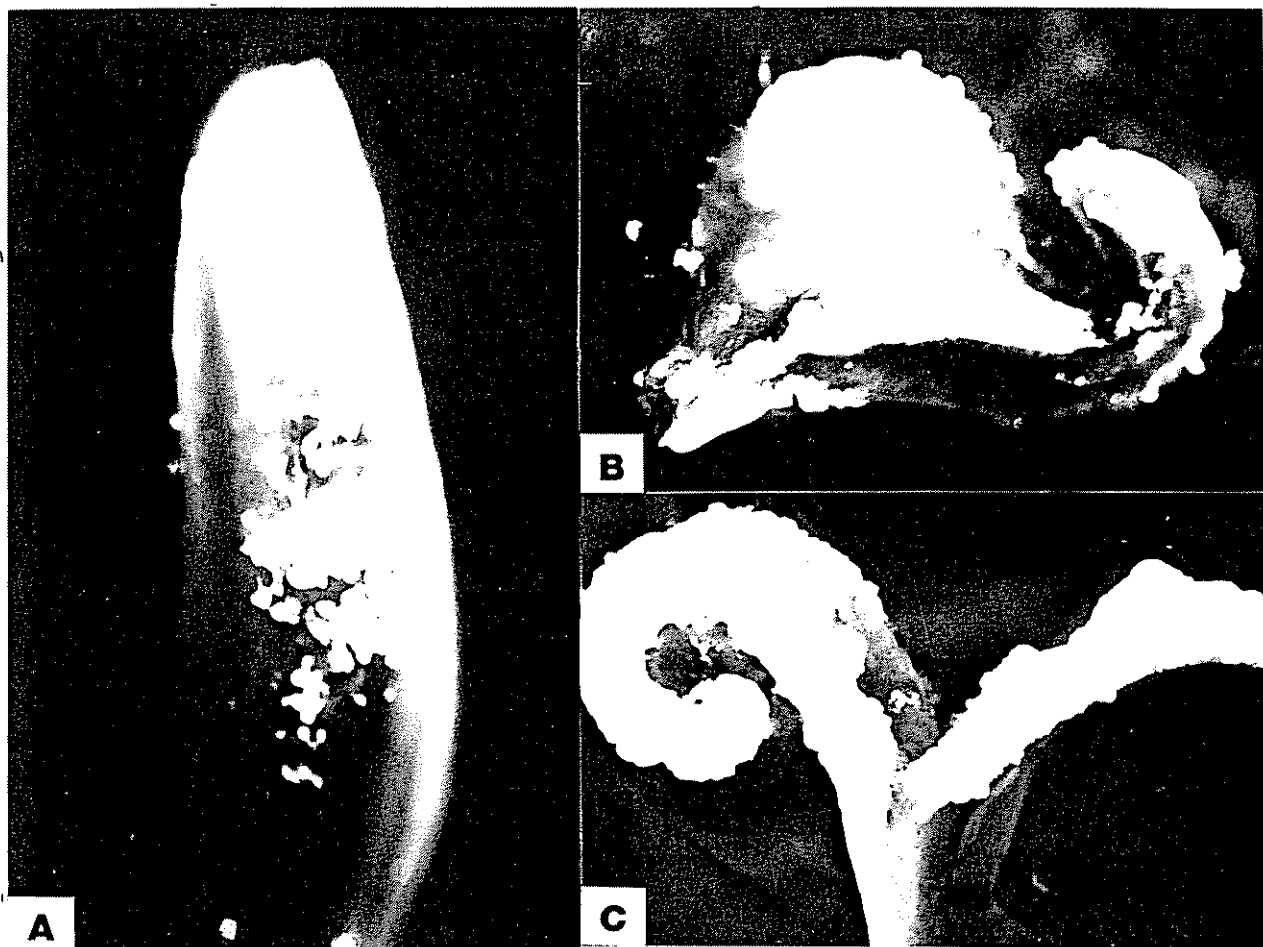


Fig. 8 Desarrollo del callo a partir de la(s) antera(s).
A. Callo que se forma sobre las paredes (epidérmico);
B. Formación a partir de la base de la cicatriz del filamento; C. Formación a partir del interior de la antera.

citoplasma denso con alto contenido de ARN, núcleo central grande con un nucleolo único, pocas vacuolas pero con contenido de almidón (Michaux *et al*, 1985).

4.2.1.4. Viabilidad de las microesporas.

Para la segunda evaluación de la viabilidad de las microesporas se tomaron cuatro anteras al azar. En el cultivar Caturra no hubo diferencias de viabilidad entre los tratamientos (Fig.10). En el caso de las introducciones Colombia y Garnica, la desinfección C fue ligeramente mejor y la viabilidad de las microesporas fue diferente dependiendo de la desinfección utilizada. Así, se puede observar que la viabilidad para la introducción Colombia fue mayor con la desinfección C y para Garnica con la desinfección B (figura 10).

Cuadro 5. Porcentaje de viabilidad de las microesporas, siete y quince días después de la siembra del material.

Cultivar	Desinfecciones (%)		
	B Viable	C Viable	D Viable
Garnica +	66.1	99.4	80.6
(12855) ++	48.8	92.7	24.5
Caturra +	93.7	82.6	97.3
(2308) ++	65.4	59.0	58.7
Colombia +	93.2	93.9	81.0
(8927) ++	85.2	66.2	2.2

+ Evaluación a los siete días.

++ Evaluación a los quince días.

El análisis microscópico de cuatro anteras seleccionadas al azar, para cada cultivar, mostró una gran cantidad de granos de polen viables, en comparación con los

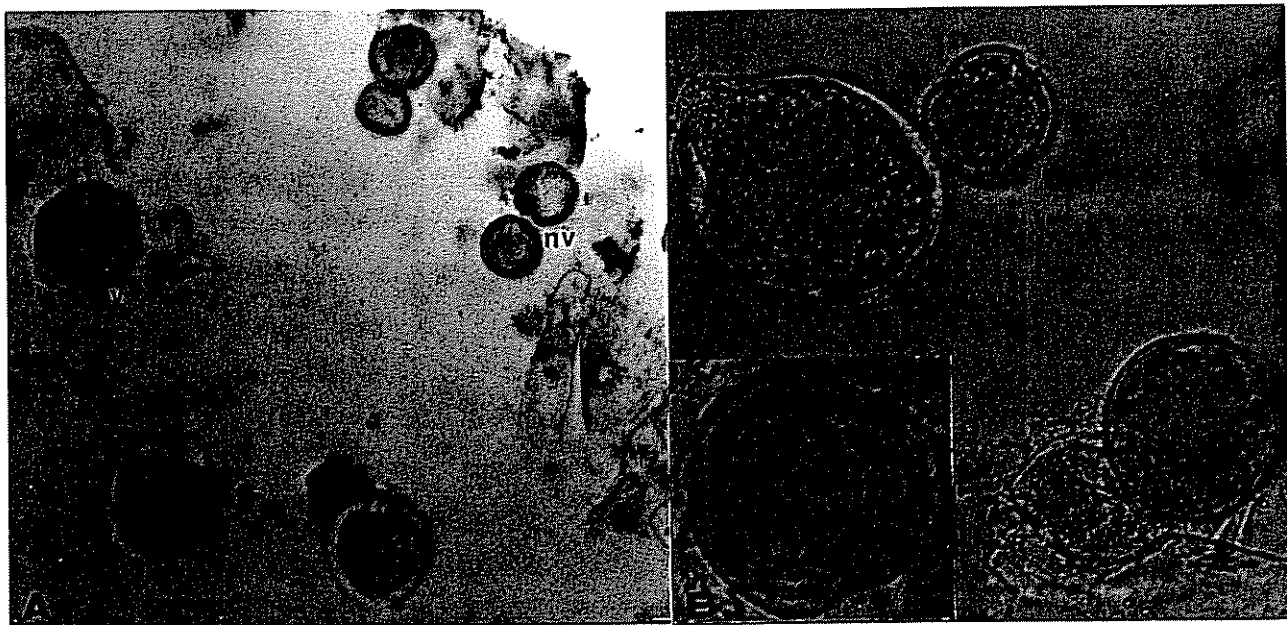


Fig. 9 A. Comparación de las microesporas viables (v) y no viables (nv). Obsérvese la diferencia en tamaño y contenido citoplasmático; B Aumento en tamaño y contenido citoplasmático de las microesporas. Obsérvese el núcleo y nucleolo en el recuadro interior.

no viables (Cuadro 5). La viabilidad se midió, utilizando el reactivo de Alexander el cual tiñe de color rojo los viables y celeste los no viables. También se usó el Acetocarmín que tiñe de rojo los granos viables. Los granos de polen poseían un balance núcleo - citoplasma alto, con núcleo y nucleolos grandes y un citoplasma denso (Fig.9b).

Algunas microesporas presentaron también, gran cantidad de granos de almidón, lo cual se comprobó utilizando el colorante Iodo yoduro (IKI_2). Este colorante tiene la propiedad de teñir el almidón en marrón oscuro. Algunos granos de polen crecieron de dos a tres veces su tamaño

normal y aumentó en ellos la concentración de almidón. Sin embargo, no se observó ningún tipo de división celular (Fig.9). Este aumento en la cantidad de almidón puede hacernos pensar en un aumento en el metabolismo de las microesporas, lo que pudiera considerarse como preparación para la división mitótica. Dawkins y Owens (1993), reportan que en el caso de gimnospermas se ha encontrado la presencia de gran cantidad de almidón 24 horas antes de la germinación *in vitro* del grano de polen. Dexheimer, citado por Dawkins y Owens (1993), informa que en Angiospermas la germinación *in vitro* del grano de polen no está acompañada de acumulación de almidón y que el núcleo generativo se encuentra prácticamente inactivo en comparación al vegetativo.

Considerando todas las variables estudiadas es importante hacer notar que independientemente del método de desinfección empleado, todas las anteras evaluadas presentaban oxidación parcial o total. Esta oxidación no impidió el desarrollo de callos sobre las paredes de la antera, ya que inclusive para el cultivar Garnica el

tratamiento de desinfección B mostró un aumento en el porcentaje de callos con respecto a la evaluación efectuada a los siete días (cuadro 5).

Por otro lado, se observó que algunas anteras poseían gran cantidad de polen, mientras que otras del mismo cultivar o cultivares diferentes, tenían pocos granos. Esto hace que el total de granos de polen estudiados por desinfección, muestre diferencias entre sí.

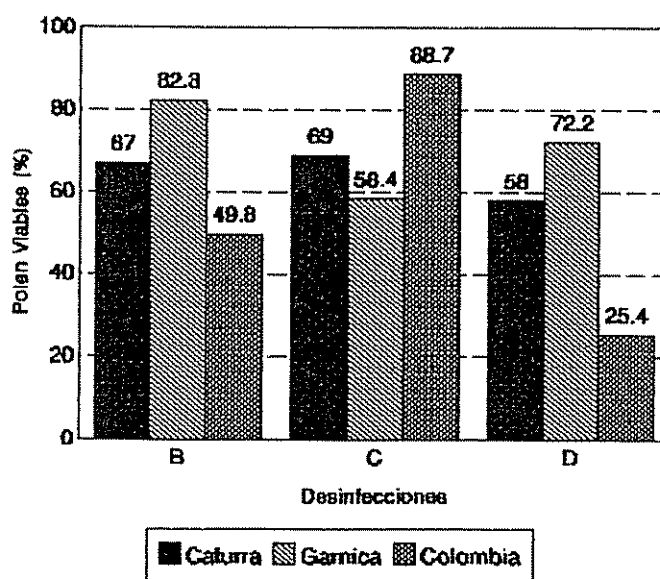


Fig. 10 Evaluación de tres métodos de desinfección, midiendo la viabilidad de las microesporas en tres cultivares de café. Evaluación a los 15 días.

Sin embargo fue siempre el método de desinfección C el que dió mejores resultados para los tres cultivares en estudio.

También, debemos mencionar que, los mejores callos se obtuvieron a partir de anteras parcialmente oxidadas. Algunas anteras que manifestaron un 100% de oxidación desarrollaron un callo incipiente que no evolucionó, mientras que el callo desarrollado sobre anteras parcialmente oxidadas fue relativamente grande, de color crema claro y de consistencia friable, igual al que se encontró a los siete días de evaluación (Fig.8). Los estudios histológicos mostraron que estos callos estaban formados por células largas con poco contenido citoplasmático y algunas redondas con mucho almidón, dando la apariencia de células con poca posibilidad embriogénica.

Entre los siete y quince días se observó un aumento considerable en la mortalidad de las microesporas, utilizando los tres métodos de desinfección (Fig. 10).

Los resultados anteriores se vieron reflejados, también, al momento de hacer los conteos generales de microesporas que había en cada una de las anteras evaluadas. Fue notorio que las que se evaluaron a los siete días tenían un mayor número de microesporas que aquellas evaluadas a los quince días. Conforme pasa el tiempo, las microesporas se deterioran y es posible que algunas de ellas se destruyan al momento de efectuar la maceración (Cuadro 5).

4.3. PRETRATAMIENTOS

4.3.1. Choque Térmico.

En este ensayo, las anteras de los tres cultivares en estudio se sometieron a diferentes temperaturas (5°C, 28°C) por diferentes tiempos (0, 2, 4, y 8 días) y posteriormente se sembraron en dos medios de cultivo (MS y B-5). Se hicieron dos evaluaciones a los quince y treinta días, notándose poca diferencia en las observaciones; razón por la

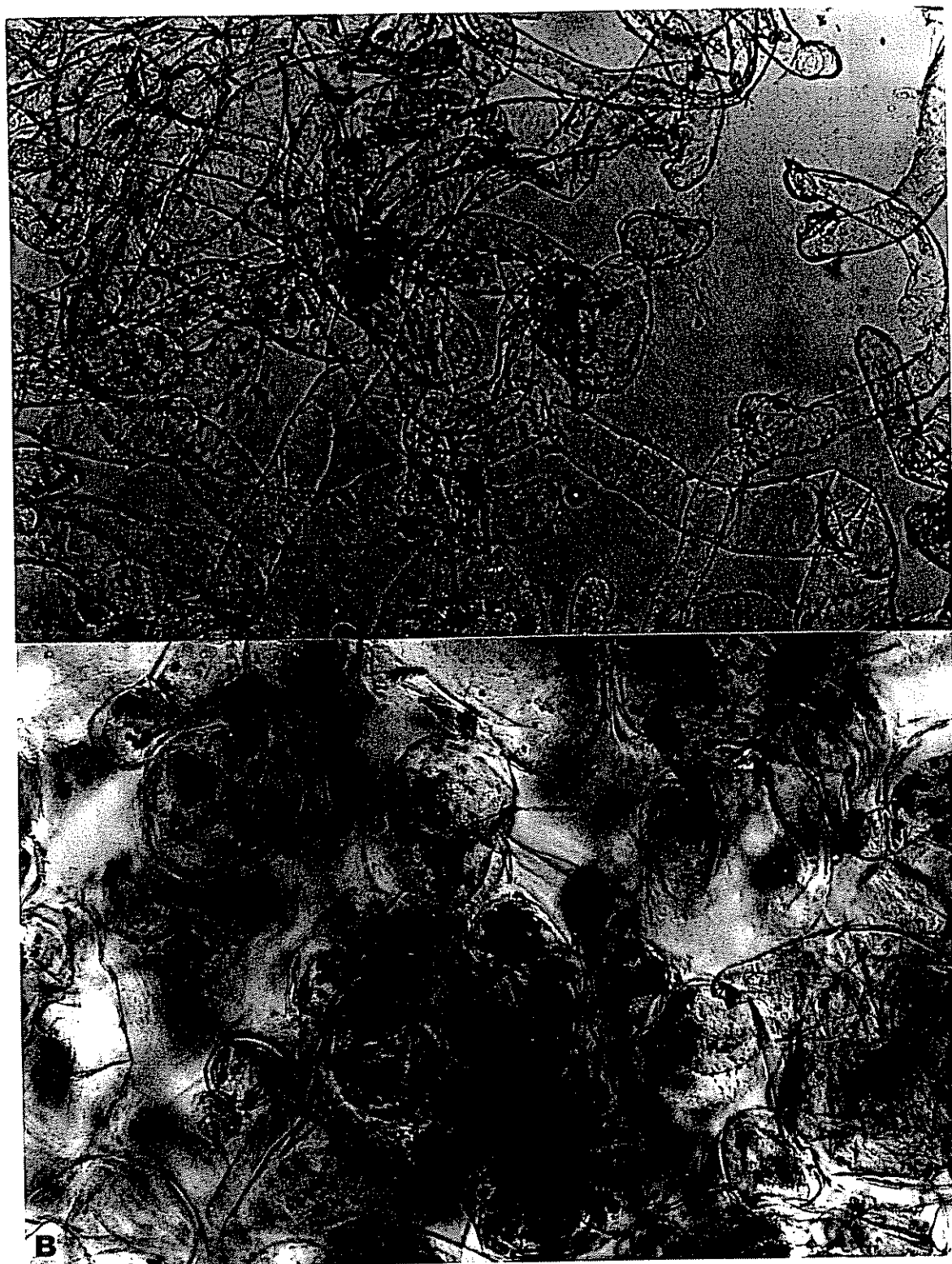


Fig. 11 Tipo de células que conforman el callo. A. células largas (20x); B. Células redondeadas con granos de almidón (20x por 1.6x).

cual se procedió a realizar un análisis global de los resultados. Analizando el desarrollo de callos se encontró que no hubo diferencias significativas entre las introducciones. Esto es, que los cultivares Garnica, Caturra y Colombia tuvieron respuestas parecidas ante el choque térmico y los medios de cultivo.

Los pretratamientos, los medios de cultivo y la interacción de ambos mostraron diferencias altamente significativas. Los pretratamientos fueron identificados del uno al seis; donde los pretratamientos uno, dos y tres no muestran diferencias con el control, mientras que los pretratamientos cuatro, seis y cinco muestran diferencias altamente significativas con el control (cuadro 6). El modelo estadístico utilizado explica en un 94% los resultados obtenidos.

Cuadro 6. Prueba de Dunnett's. Comparación de los seis pretratamientos vs el control ante la variable producción de callos para tres cultivares de *Coffea arabica*.

Tratamiento	Límite Superior	Diferencia entre medias	Límite inferior
1 - 7	-1.811	-0.003	1.804
2 - 7	-2.403	-0.595	1.212
3 - 7	-2.421	-0.614	1.193
4 - 7	-7.296	-5.489	-3.681***
5 - 7	-8.299	-6.492	-4.684***
6 - 7	-8.299	-6.492	-4.684***

Las anteras controles (sembradas sin pretratamiento), desarrollaron un número mayor de callos, en comparación a las anteras sometidas al choque térmico de 28°C. Esta diferencia resultó más notoria cuando las anteras fueron sometidas a 28°C por cuatro u ocho días. Las anteras que fueron sometidas a temperaturas de 5°C por dos, cuatro y

ocho días también desarrollaron cantidades de callo iguales o parecidas al testigo (Cuadro 7). El medio de cultivo donde se desarrolló un mayor número de callos fue el medio B-5, en comparación al medio MS donde la respuesta fue menor. La diferencia entre los medios de cultivo según Boocon y Gibod (1989), radica básicamente en el balance iónico de los mismos. En el medio de Gamborg la concentración iónica total es de $60.2 \mu\text{m}$ en comparación al medio MS cuya concentración es de $93 \mu\text{m}$. Otro aspecto importante es el balance de nitrógeno amonio de 1.91 para MS y de 12.50 para B-5 lo que pudiera favorecer el desarrollo de las microesporas. La concentración de iones Cl es mayor en el medio MS, esto pudiera ser tóxico para las microesporas y contribuir a su destrucción (Anexo 5b).

La prueba de Tukey agrupa los tratamientos en dos grupos: el primero formado por el control, y los pretratamientos uno, dos y tres, lo que nos indica que las respuestas de estos tratamientos al desarrollo de callos es similar al control. El otro grupo está compuesto por los tratamientos cuatro, cinco y seis (Cuadro 7). Las anteras que fueron sometidas a temperaturas de 28°C , reaccionaron muy levemente cuando el lapso de tiempo fue de dos días, obteniéndose una respuesta mayor cuando estas fueron sembradas en el medio B-5 en comparación a cuando se sembraron en el medio MS.

Al aumentar a cuatro y ocho días el tiempo de exposición, no se observó desarrollo de callos, y hubo oxidación de la mayoría de ellas. También se observó gran cantidad de microesporas no viables las cuales pudieron perder su viabilidad debido a la oxidación de las anteras. Es conocido que los granos de polen almacenados a temperaturas ambiente pierden rápidamente su viabilidad. Seguramente, ocurre lo mismo para las microesporas

(Cambrony, 1989).

Cuadro 7 Prueba de Tukey's para comparar las medias de los pretratamientos y el control ante la variable desarrollo de callos en café.

Tukey's	Medias	Tratamientos
A	7.199	Control
A	7.195	1
A	6.604	2
A	6.585	3
B	1.710	4
B	0.707	6
B	0.707	5

La interacción pretratamientos medio de cultivo pone de manifiesto que al combinar el pretratamiento de 5°C por dos días con el medio B-5, se desarrolló un mayor número de callos. El segundo mejor resultó ser el control sembrado en medio B-5. Otro pretratamiento que tuvo un alto número de callos fue cuando las anteras estuvieron expuestas a temperaturas de 5°C por cuatro días (Figura 11).

Muchos experimentos realizados para obtener embriones a partir del cultivo de anteras, coinciden en que la utilización de bajas temperaturas, como un pretratamiento obligado, aumenta la respuesta ante los tratamientos. Wolyn y Feng (1993), utilizaron temperaturas de 5°C por 24 horas en las anteras de *Asparagus officinalis*, coincidiendo en que la cantidad de embriones aumentaba. Devaux, et al (1993), utilizaron pretratamientos de 4°C por 28 días en anteras de genotipos recalcitrantes de cebada, encontrando un incremento en el número de embriones y en el total de plantas verdes producidas. Estos resultados coinciden con los de Ascanio y Arcia (1994), trabajando con *Coffea arabica* variedad Garnica, quien reporta un incremento en el número de callos con aquellas anteras que fueron sometidas a

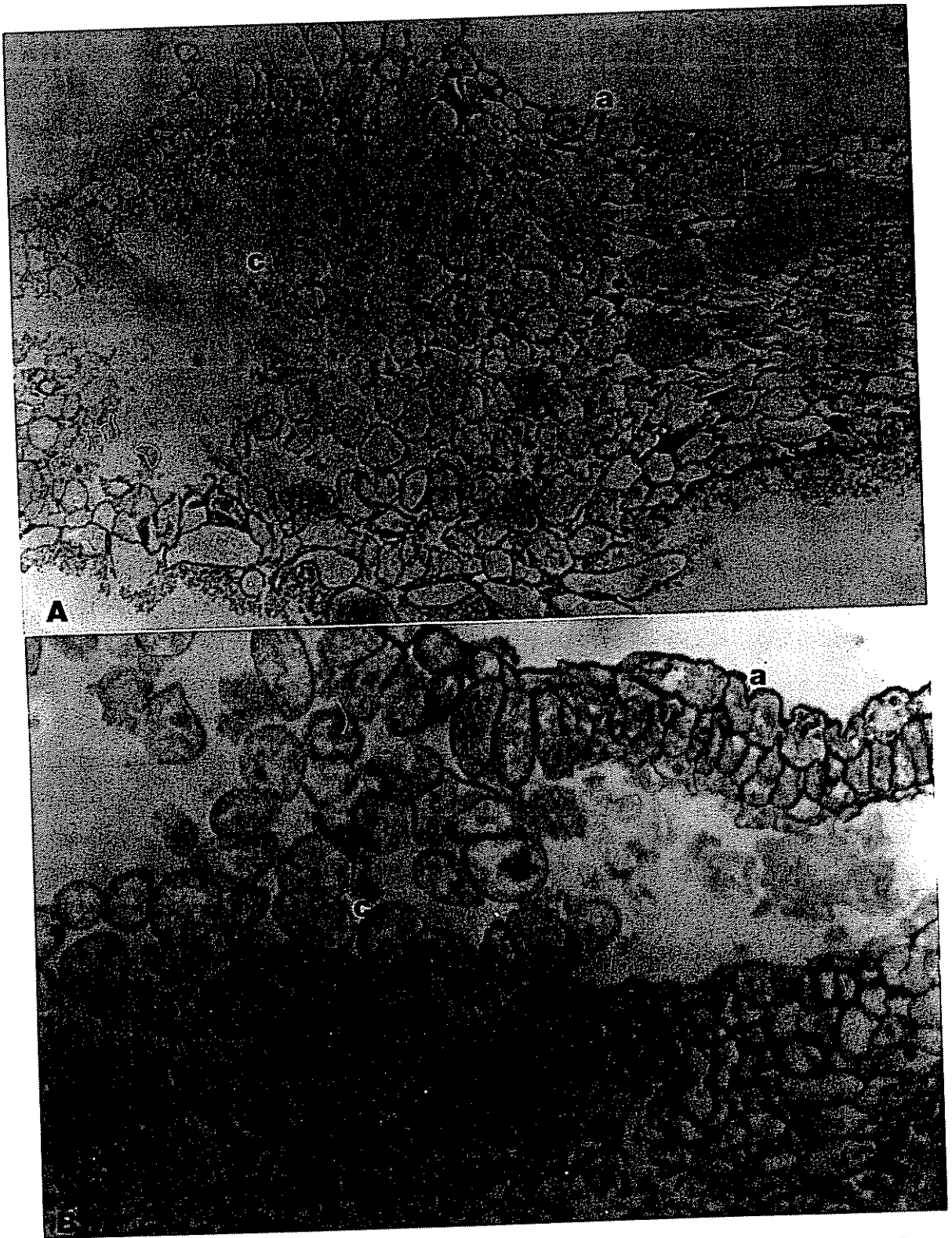


Fig. 13 A. y B. Desarrollo del callo a partir de las paredes internas de la antera. (20x) (20x por 1.6x).

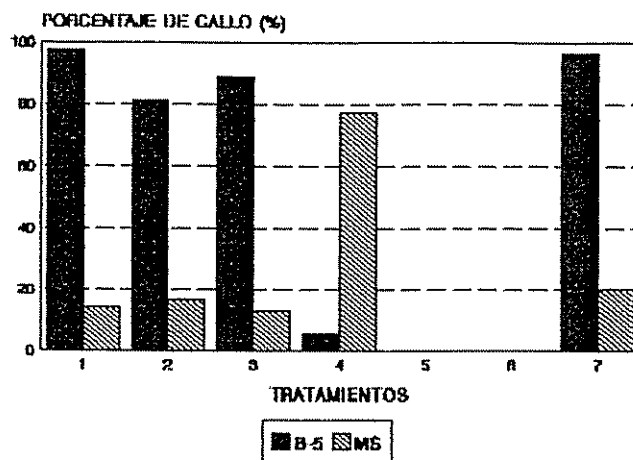


Fig. 12 Evaluación de la interacción tratamientos*medios para la variable callos en café. Evaluación a los 30 días.

temperaturas de 5°C durante 48 horas.

En anteras del cultivar Caturra sometidas a temperaturas de 5°C por ocho días, después de 30 días de sembradas se observó un alto porcentajes de microesporas no viables. A las tres semanas de sembradas las anteras se observó el crecimiento de callos epidérmicos, muy transparentes con pocas características embrionarias en los tres cultivares. En estos casos, la ausencia de un balance hormonal apropiado en el medio de cultivo pudo inhibir la respuesta embrionaria del callo y/o el desarrollo de los embriones. Otra posibilidad pudo haber sido que el genotipo de los cultivares escogidos para esta investigación tuviesen una baja respuesta a los pretratamientos utilizados. Devaux et al. (1993), encontró que uno de los mayores problemas encontrado en el cultivo de antera de cereal es que algunos genotipos presentan una baja respuesta o no responden a la técnica.

En nuestro caso las pruebas de Tukey y Dunnetts concuerdan al indicar que no hay diferencias entre el testigo y los tratamientos uno, dos y tres los cuales fueron expuestos a bajas temperaturas. Las posibilidades de obtener embriones haploides de manera espontánea son muy bajas, razón por la cual la mayoría de los investigadores recomiendan el uso de un pretratamiento que puede ser aplicado tanto a la planta donadora como al explante a utilizar. Lashermes, et al (1993), han desarrollado una metodología para la obtención de plantas haploides a partir de poliembriones presentes en semillas inmaduras de *Coffea canephora*, obteniendo en algunos genotipos más favorables hasta cinco plantas haploides por cien semillas observadas.

En algunos casos se pudo observar un aumento en el número de callos de aquellas anteras que habían sufrido el choque térmico. Algunas anteras sometidas al pretratamiento de 5°C por cuatro y ocho días y después de diez días de ser sembradas mostraron microesporas con mucho contenido de almidón y de lípidos, dando la impresión de una célula próxima a dividirse.

Los estudios histológicos para los tres cultivares no mostraron cambios importantes. En términos generales, los callos producidos estaban formados por células grandes, sin forma definida, de crecimiento irregular y con poco contenido. También se observaron células de callos que provenían de las paredes más internas del callo (Fig. 13), lo que nos indica que es muy poco probable que sean células proembriogénicas. Además, en ninguno de los tres cultivares se observaron microesporas en división.

En general todas las anteras con callos fueron pasadas a medio de Pierson y Yasuda después de cuatro semanas, para tratar de inducir el desarrollo de embriones. La respuesta

que se obtuvo en anteras que previamente habían sido tratadas a temperaturas de 5°C por cuatro y ocho días fue un aumento de tamaño (5-6mm), del callo, presentaban coloración blanco crema y fueron menos friables. El estudio histológico reveló que no estaba formado por células embriogénicas (Fig. 14).

4.3.2 Choque térmico y centrifugación .

En esta fase se midió el efecto combinado de la centrifugación y la temperatura sobre la producción de callos y/o embriones. En vista de que solamente se produjeron callos esta fue la variable que analizamos.

Al igual que en la fase anterior la prueba estadística aplicada dá un resultado altamente significativo para los pretratamientos y el medio de cultivo y significativa para la interacción medio*pretratamiento. Las introducciones: Caturra, Garnica y Colombia no fueron significativas, esto coincide con el resultado obtenido en la fase anterior, por lo tanto indica que no hay respuestas diferentes ante la variable producción de callos por parte de los cultivares. La interacción pretratamiento por medio fue significativa a nivel de 0.05 con una $P > 0,0295^*$.

El control absoluto obtuvo los mayores porcentajes de callos para esta fase y fue significativo con respecto a todos los pretratamientos incluyendo los controles parciales. El resto de los pretratamientos no se observó diferencias significativas entre ellos ante la variable producción de callos. El modelo estadístico justifica en un 81% los resultados obtenidos (Fig.15).

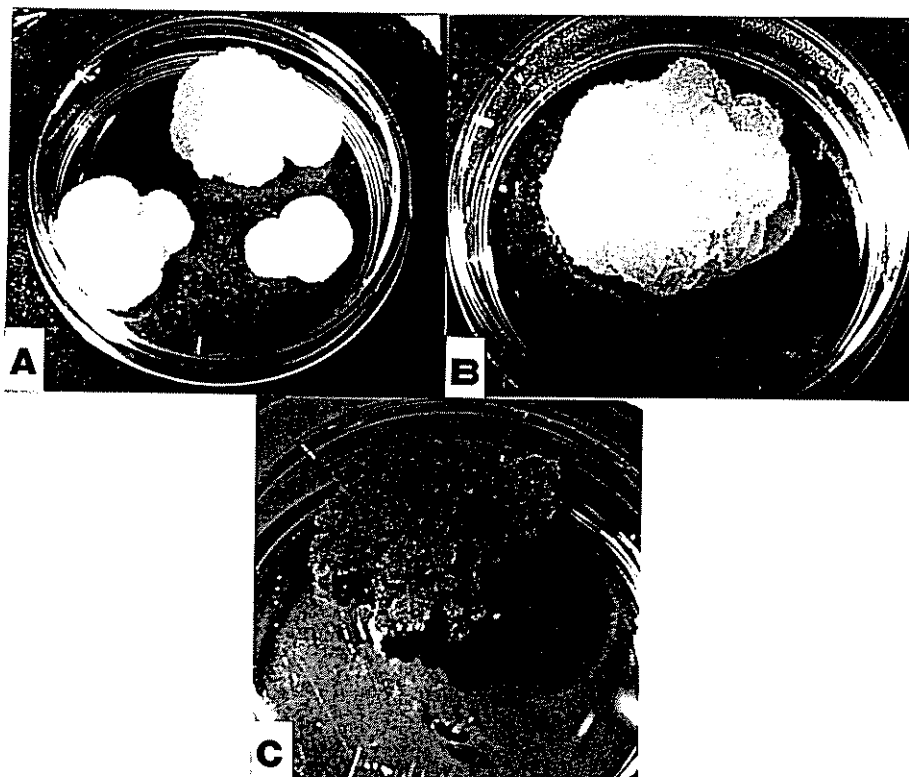


Fig. 14 Tipos de callo que se desarrollan de la antera que ha recibido: A. Pretratamiento Térmico; B. Térmico y centrifugación; C. Medio de Yasuda.

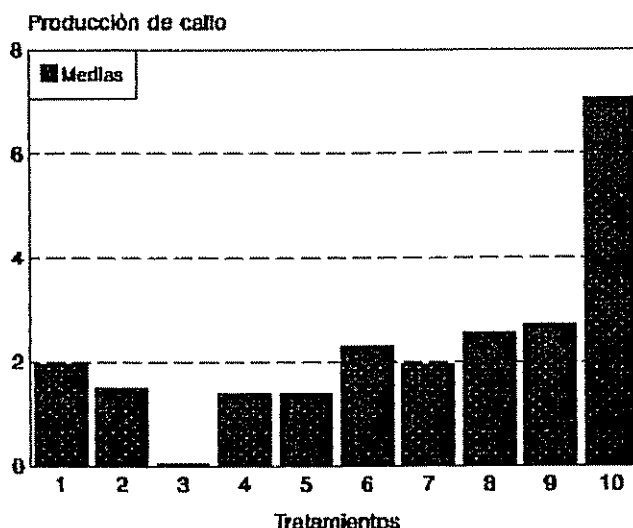


Fig. 15 Efecto de la temperatura y centrifugación sobre la producción de callo en anteras de café. Evaluación a los 30 días.

Aparentemente los pretratamientos no ejercieron ningún efecto sobre las microesporas, esto pudo deberse a que estos se aplicaron antes de la primera división meiótica. Inicialmente la baja temperatura pudo haber minimizado su normal evolución no alcanzando nunca esta división y por lo tanto el efecto de la centrifugación más la temperatura prácticamente no se realizó. Este no efecto de los pretratamientos fue observado por Sangwan-Norrel (1977) cuando trabajó con anteras de *Datura innoxia*, donde la aplicación de bajas temperaturas y centrifugación tuvieron un pequeño efecto o algunas veces fueron desfavorables cuando fueron aplicados antes de la primera división haploide.

Los cortes histológicos de las anteras sometidas a los pretratamientos de centrifugación y temperatura muestran que

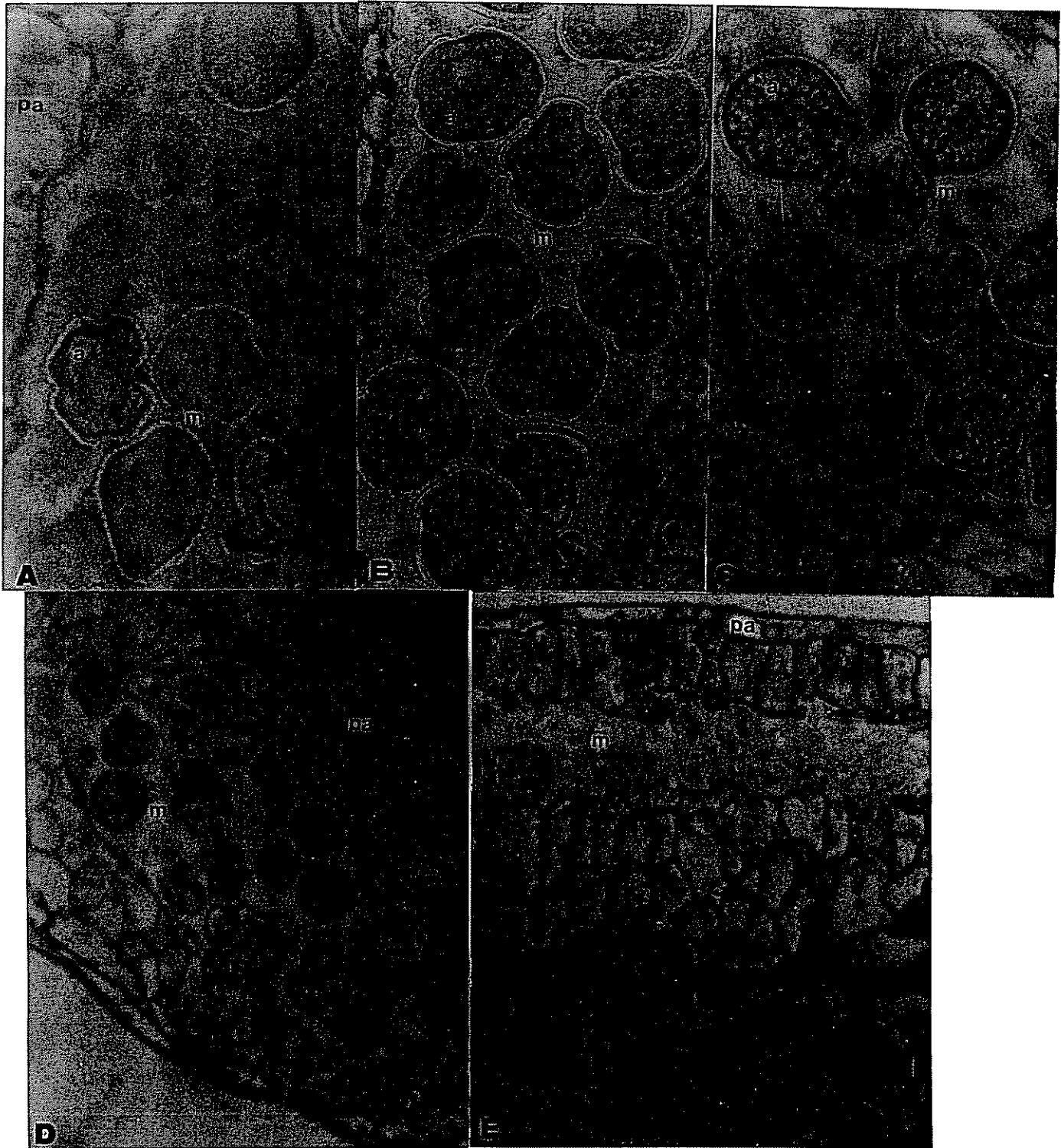


Fig. 16 Estado de las microesporas después de ser sometidas a los pretratamientos de centrifugación y temperatura. A. 5°C x 2 días + Centrifugación por 20 minutos; B. 5°C x 2 días + Centrifugación por 40 min.; C. 5°C por 2 días + Centrifugación por 60 min.; D. 5°C por 2 días; E. 5°C por 4 días. m. microspora; a. almidón; pa. pared de la antera.

las anteras permanecen en un buen estado al igual que muchos de sus microesporas. Aquí cabe resaltar el cultivar Garnica en el cual se apreciaron las microesporas en mejor estado. Los otros cultivares mostraron mayor deterioro de dichas células. El cultivar Garnica presenta características inherentes más favorables para el cultivo de anteras.

También se observaron que al colocar las anteras en el pretratamiento de temperatura, las microesporas sufren más deterioro que cuando se combinan los pretratamientos de temperatura y centrifugación. Además, la centrifugación por cuarenta y sesenta minutos aparentemente dió mejores resultados que la centrifugación por 20 minutos ya que el deterioro de los granos de polen en esta última fue más evidente. (Fig. 16).

4.3.3. Choque Osmótico

En esta fase se sumergieron 30 anteras por cultivar en dos soluciones estériles de sacarosa al 20 y 40% por una hora. Luego fueron sembradas en los medios MS y B-5 y colocadas en la oscuridad. La evaluación se realizó a los 15 y 30 días.

4.3.3.1 Sacarosa 20% por una hora.

En Caturra, Garnica y Colombia a los quince y treinta días no se observó desarrollo de callos, lo que puede indicar que estas introducciones son muy sensibles al cambio osmótico, que la concentración de sacarosa fue excesiva, o que el tiempo de exposición fue inadecuado. En el estudio histológico se observaron tanto granos de polen viables como no viables. Para el cultivar Garnica se hicieron conteos de viabilidad de los granos de polen encontrándose que para aquellas anteras sometidas a 20% de sacarosa la

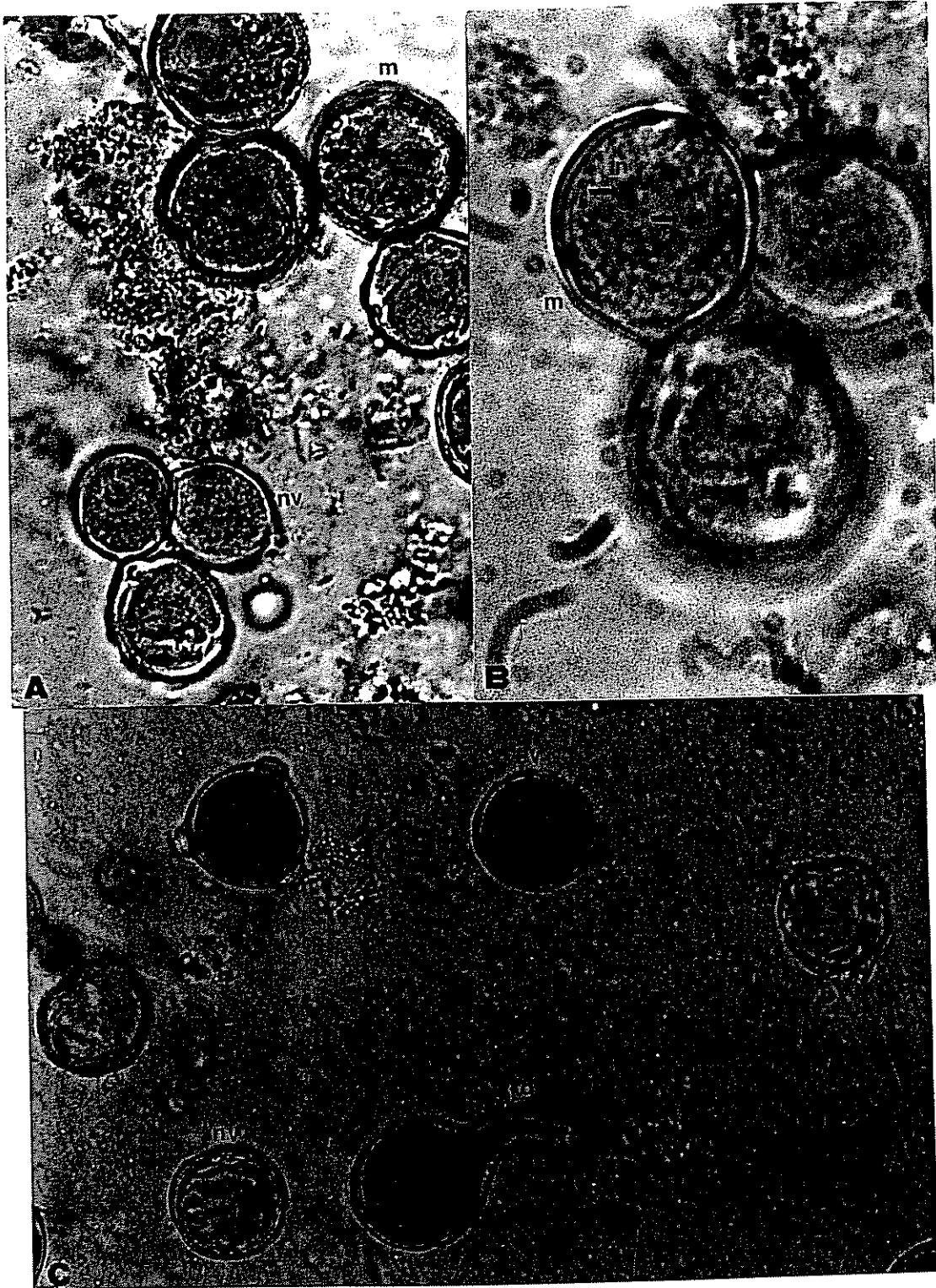


Fig. 17 Estado de las microesporas después de ser sometidas a una presión osmótica de sacarosa al 20% y 40%. Nótese la viabilidad y germinación de algunas de ellas, así como la presencia de dos nucleolos. n. nucleolos (20x por 1.6x); m. microspora (20x); tg. tubo germinativo; nv. no viable (20x).

viabilidad estuvo alrededor del 32.2%, en comparación al control donde se encontró un rango de viabilidad de más o menos 29.0%.

Es interesante señalar que para Garnica se observó en las microesporas un 16.45% de núcleos con dos nucleolos, y en el control no se observaron. La presencia de dos o más nucleolos dentro del núcleo es indicativo de gran actividad nuclear. Además el contenido citoplasmático de estas células estaba muy alto y contenía gran cantidad de reservas de almidón (Fig. 17). Zamarripa (1993), observó núcleos con dos y tres nucleolos antes de empezar la división de las células del callo embriogénico en café.

Cuadro 8 Prueba de Duncan para comparar el efecto de la sacarosa, sobre la viabilidad de las microesporas del cultivar Garnica. Evaluación a los 30 días.

Duncan	Medias	%	Tratamiento	Dos Núcleolos
A	0.533	32.2	Sac. 20%	70 anteras
A	0.485	29.0	Control	0 "
A				
B	0.254	14.7	Sac. 40%	2 "

4.3.3.2 Sacarosa 40% por una hora.

Para Caturra y Colombia a los 15 y 30 días no se observó producción de callos. Las anteras estaban en su mayoría parcialmente oxidadas e hidratadas. Se realizaron macerados de las anteras observándose algunas microesporas viables en estado uninucleado y otras maduras. La mayoría de las microesporas se encuentran no viables.

Para Garnica se observó un 21.11% de callos a los 30

días, siendo el único de los tres cultivares que tuvo una respuesta positiva. El estudio histológico reveló la presencia de dos nucleolos en los núcleos de 0.72% de las microesporas observadas, siendo un porcentaje mucho menor que los observados cuando se sometieron a una presión de sacarosa de 20%.

Cuadro 9. Porcentaje de anteras viables para el cultivar Garnica evaluación a los 30 días.

	Viable	%	No Viable	%	Dos Nucleolos
Sacarosa	42	3.3	1229	96.7	0
40%	44	3.4	1264	96.6	0
	21	1.3	1557	88.6	0
	276	25.8	792	74.2	2

4.4. Medios de Cultivo: Auxinas y Citocininas

4.4.1 Inducción de callos

En esta fase se evaluaron por separado dos grupos de tratamientos. El primer grupo poseía como medio básico el medio de MS al cual se le agregaron diferentes concentraciones de 2-4 D y cinetina (Cuadro 1) y fueron identificados como tratamiento uno, dos, tres y cuatro .

El segundo grupo tenía el medio B-5 como base, al cual se le agregaron diferentes concentraciones de AIB y cinetina (Cuadro 1), siendo identificados como tratamientos cinco, seis siete y ocho. En esta fase se evaluó la producción de callos entre los tratamientos.

Para los tratamientos uno, dos, tres y cuatro no se observaron diferencias significativas ($Pr > 0.4730$) para el cultivar Caturra lo mismo se observó para el cultivar

Garnica ($Pr > 0.9804$) y Colombia ($Pr > 0.3823$) lo que significa que todos los tratamientos aplicados actuaron sobre las anteras provocando el mismo tipo de respuesta (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de anteras con callos por introducción para los tratamientos uno, dos, tres y cuatro. Evaluación a los cinco meses.

Introducción	(%) anteras con callo			
	T1	T2	T3	T4
Caturra	71.97	76.78	75.13	74.17
Garnica	82.72	80.34	81.91	80.59
Colombia	81.90	76.59	81.79	81.91

La respuesta a los tratamientos cinco, seis siete y ocho fue similar al grupo anterior pues no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos para el cultivar Caturra ($Pr > 0.1552$), Garnica ($Pr > 0.3577$) y Colombia ($Pr > 0.3823$). Lo único que podemos observar fue una tendencia en la cual las anteras sembradas en medio básico B-5 de los tres cultivares: Caturra, Garnica y Colombia produjo una ligera elevación del número de anteras con callos en los tratamientos siete y ocho, para los cuales utilizamos AIB + Cinetina.

El 2,4- D es una auxina sintética muy utilizada para la inducción de callos embriogénico en casi todos los cultivos *in vitro*. Aparentemente ella brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo (Roca et al 1991). El AIB es otra auxina sintética cuyo uso no es común, en este estudio se utilizó para observar sus efectos ya que el 2,4-D es de uso más frecuente en la mayoría de los cultivares incluyendo café. No se encontró diferencias entre los tratamientos. La cinetina se utilizó como sustancia estimuladora de la división celular. Con la presencia de

hormonas la diferencia entre los medios minerales no es tan aparente como en la fase anterior. Santana (1989), trabajando con embriones *in vitro* de *C. arabica*. encontró que la presencia de auxinas exógenas no parece ser indispensable para el desarrollo de los embriones, sinó por el contrario, se observó cierto efecto inhibitorio en el crecimiento de los mismos.

Cuadro 11. Porcentaje de anteras con callos para los tratamientos cinco, seis, siete y ocho. Evaluación a los cinco meses.

Introducción	(%) de anteras con callos			
	T5	T6	T7	T8
Caturra	76.1	77.3	81.4	86.6
Garnica	78.2	79.7	85.4	86.9
Colombia	87.6	77.0	86.1	81.8

4.4.2 Inducción de Embriones

Las anteras que presentaron crecimiento de callos fueron pasadas a medio de Pierson y Yasuda. Solamente un callo proveniente del T4 que previamente había sido sometido a un choque térmico de 5°C por dos días y centrifugación por cuarenta minutos del cultivar Garnica, después de tres meses se observó un gran crecimiento (2-3 mm). Presentó una coloración blanca y aspecto totalmente friable. Al realizarse los estudios histológico se observaron gran cantidad de células indiferenciadas, alargadas y con poco contenido citoplasmático (Fig. foto). Parte de este callo se colocó en medio de Yasuda donde solo se observó crecimiento pero su apariencia siguió siendo friable y su color blanco crema, no se observó crecimiento de embriones. No se observó respuesta cuando fueron colocados en medio de

Pierson. En ninguno de los casos se observó crecimiento de embriones.

Este resultado pudo deberse a la pérdida de la capacidad embriogénica del callo, ya que desde el momento en que fue plateado por primera vez y pasada a uno de estos medios habían transcurrido 12 semanas.

C O N C L U S I O N E S

- El tamaño óptimo de botón floral varió según el cultivar estudiado. Para Caturra fue de 7mm, Garnica 8mm y Colombia de 8 y 9mm.
- El café es un cultivo con un alto grado de contaminación inherente. Para las condiciones nuestras, el método de desinfección C mostró ser el más eficiente de los métodos probados.
- Cada cultivar responde de manera diferente a las desinfecciones.
- El método de desinfección C obtuvo los mayores porcentajes de anteras que desarrollaron callo.
- La adición de hormonas no es indispensable para la obtención de callos pero si son imprescindibles para su posterior desarrollo (obtención de embriones).
- Las anteras de los tres cultivares desarrollaron un mayor número de callos en el medio B-5 que en MS.
- Los pretratamientos aplicados no mostraron el efecto deseado sobre los cultivares en estudio.
- El cultivar Garnica en general mostró condiciones inherentes superiores para el cultivo de anteras.
- Los estudios histológicos permitieron observar que algunas microesporas resisten tanto las desinfecciones como los pretratamientos y en algunos casos presentan aumentos de tamaño y mayor acumulación de almidón.

- Los estudios realizado a los callos mostraron que están formados por células que casi no poseen contenido. No fue posible observar células embriogénicas.

R E C O M E N D A C I O N E S

- Realizar control histológico de las microesporas de manera continua durante los primeros quince días después de sembradas las anteras.
- Adquirir un microtomo de resina para facilitar y mejorar el trabajo de investigación.
- Sembrar un solo explante por tubo o plato Petri.
- Utilizar el choque osmótico para la variedad Garnica.
- Utilizar el cultivar Caturra en las pruebas de choque térmico y centrifugación.
- Ampliar el estudio de Auxinas y Citoquininas utilizando otras hormonas.
- Utilización de un solo cultivar para este tipo de estudio cuando la investigación sea por menos de un año.
- Poner las anteras a crecer en un medio conteniendo diferentes concentraciones de sacarosa.
- Una vez que empiecen a formarse los callos, pasarlos rápidamente a otro medio de cultivo con el fin de estimular su capacidad embriogénica.
- Utilizar el medio de Gamborg B-5 como medio básico para el cultivo de anteras de café.
- Utilizar el hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos como método de desinfección.

REVISION DE LITERATURA

- ACOSTA, C. 1981. Plantas haploides de tabaco y trigo por cultivo de anteras: las sobrevivencias del polen y la androgénesis *in vitro*. Tesis profesional par obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. de Ciencias.
- ASCANIO, C.E. 1987. Inducción de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras de cafeto *Coffea arabica* L. "Garnica". Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. (Tesis Doctoral). 89 p.
- ASCANIO, C.E. 1988. Formación de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras. In: Cultivo de Tejidos Vegetales Aplicado a la Producción Agrícola. L. Villegas, edit. Signo contemporáneo, Caracas, Venezuela. 218 p.
- ASCANIO, C.; ARCIA, A.M.. 1994. Efecto del estado de desarrollo de las anteras y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. Var. Garnica. Café Cacao Thé vol XXXVIII n°2, avril-juin.
- BAJAJ, Y.P.S. 1978. Induction of repeated cell division in isolated pollen mother cells of *Atropa belladonna*. Plant. Sc. Lett. 3:309-312.
- BAJAJ, Y.P.S. 1984. *In vitro* production of haploids. In: Hand Book of Plant Cell Culture. p. 228 - 287.
- BERTHAUD, J.; CHARRIER, A.; COUTURON, E.; LOUARN, J.; VALVERDE, V.. 1987. Asic, 12° Colloque, Montreux. p. 453- 458.
- BOCCON-GOBOD, J. 1989. La technologie de la culture *in vitro*. In: La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed Lavoisier, 225p.

- BOURGIN, J.P.; NITSCH, J. P. 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. Ann. Physiol. 9:377 - 382.
- CAMBRONY, H.R.. 1989. Le cafeier, ed maisonneuve y Larose, Paris 166p.
- CARNEIRO, M. 1993. Induction of double haploids in *Coffea arabica* cultivars via anther or isolated microspores culture. 15° Colóquio Científico Internacional sobre el café. Montpellier ASIC, p 133.
- CHAUVIN, J.; YANG, Q.; LE JEUNE, B.; HERVÉ, Y. 1993. Obtention d'embryons par culture d'anthers chez le chou-fleur et le brocoli et évaluation des potentialités du matériel obtenu pour la création variétale. Agronomie 13, p. 579-590.
- CHEN, C.C. 1977. *In vitro* development of plants from microspores of rice. In vitro 13:484-489.
- CIRAD. 1989. Manuel pratique D'histologie végétale. Laboratoire de cytogénétique et d'histologie végétale, 61 p.
- CLAPHAM, D.H. 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. Z Pflanzenzuchtg 69:142 - 155.
- CLAPHAM, D.H. 1977. Haploid induction in cereals. In: Applied and Fundamental aspects of Plant Cell, Tissue and organ culture. Ed. by J. Reinert, Y.P.S. Bajaj. p. 279 - 298, Springer Verlag.
- COLLINS, G.B. 1977. Production and utilization of anther derived haploids in crop plants. Crop Science 17: 583 - 586.
- COLLINS, G.B. 1978. Pollen and anther cultures - progress and applications. In: Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture. Ed. by K. Hughes; R. Henke; C.Milton. University of Tennessee.

- CORNIDE, M.; LIMA, H.; GALVEZ, G.; SIGARROA, A. 1985. *Genética Vegetal y Fitomejoramiento*. Editorial Científico Técnica, La Habana, Cuba.
- CROS, J.; LASHERMES, P.; MARMEY, F.; ANTHONY, F.; HAMON, S.; CHARRIER, A. 1993. Molecular analysis of genetics diversity and phylogenetic relationships in *Coffea*. ASIC, 15° colloque, Montpellier p. 41-45.
- COUTURON, E. 1982. Obtenion D'haplíodes spontanés de *Coffea canephora* Pierre par L'utilisation du greffage D'embryons. p. 155.
- DAWKINS, M.; OWENS, J. 1993. *In vitro* and *in vivo* pollen hidratation, germination, and pollen-tube growth in white spruce, *Picea glauca* (moench) voss. Int. J. Plant Sci. 154(4):506-521
- DEVAUX, T.; HOU, L.; ULLRICH, S.E.; HUANG, Z.; KLEINHOF, A. 1993. Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Reports 13: 32-36.
- DUBLIN, P. 1978. Haplíodes diploísés et obtention de Génotypes homozygotes fertiles chez les cacaoyers cultivés (*Theobroma cacao*). Café Cacao Thé vol. XXII, n°4. p. 275-284.
- DUBLIN, P.; PARVAIS, J. 1975. Note sur les premiers haplóides spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. Robusta. Café, Cacao Thé, vol. XIX n°3 p. 191-196.
- FENG, X.R.; WOLYN, D.J. 1991. High frequency production of haploid embryos in asparagus anther culture. Plant Cell Reports 10:574-578.
- FERNANDEZ, C.A. 1988. Diez Años de Labores. PROMECAFE Diez años de labores 1978 - 1988, San José, Costa Rica.
- FLORES, E. 1994. La Planta: Estructura y Función. M. Castillo, P. Retana, Editorial Tecnológica de Costa Rica, 501 p.

- FORESTIER, J.; BELEY, J.. 1969. Variabilité de la nutrition minérale et de la production des clones de caféier Robusta. *Café Cacao Thé* vol. XIII, n°4, p. 290-296.
- GALLAIS, A. 1978. Place de L Haploidie un Schema de Selection. "Le Sélectionneur Français" (26) 39 - 49.
- GALVEZ, G.C. 1976. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.). In: Manual Técnico del Cultivo del Café en El Salvador. ISIC. p 193 - 195.
- GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue cultures. In: *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture.* T.A. Thorpe (ed.). p 21 - 44.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.* 50, 151 - 158.
- GARDNER, E.J. 1991. *Principios de Genética.* Editorial Limusa, S.A. México. 716 p.
- GUERREIRO, F.. 1992. *Coffea racemosa* Lour. Une revue. *Café Cacao Thé*, vol. XXXVI, n°3 p. 171-186.
- GUHA, S., MAHESHWARI, S.C. 1964. *In vitro* production of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 204:497.
- HEPLER, P.K; PALEVITZ, B.A. 1974. Microtubules and microfilaments. *Am. Rev. Plant physiol.* 25:309 - 362.
- HU, H. 1985. Use of haploids for crop improvement in China. *Genetic Manipulation in Crops Newsletter*, 1 (1):11 - 23 p.
- HU, H; ZENG, J.Z. 1984. Development of new varieties via anther culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture.*

- HUANG, B.; SUNDERLAND, N. 1982. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. *Ann. Bot.* 49: 77 - 88.
- INSTITUTO DEL CAFE DE COSTA RICA. 1994. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. San José, C.R. 108 p. Presentado al 23 Congreso Nacional cafetalero.
- JUNNE, G. 1990. Coffee and biotechnology. *Biotechnology and Development Monitor*, University of Amsterdam, (4):21 22 September.
- KUO, C.S. 1982. Progress of anther culture of maize in China. In: *Plant Tissue Culture 1982*. Fujiwara A. ed. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokyo p 563 - 564.
- LAKSHMANA, R., DEEPESH, N.. 1987. Haploid plants from in vitro anther culture of the leguminous tree, *Peltophorum pterocarpum* (DC) K. Hayne (Cooper pod). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11, 167-177.
- LASHERMES, P., CHARRIER, A., COUTURON, E.. 1993. On the use of doubled haploids in genetics and breeding of *Coffea canephora* P.. ASIC, 15° colloque, Montpellier.
- LEON, J. 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales. Servicio editorial del Instituto Interamericano de Cooperación IICA, San José, C.R.
- LONDONO, N.C.; OROZCO, F.J.. 1986. El cultivo *in vitro* de células y tejidos del cafeto. *Cenicafé*, vol 37 (4), Octubre - Diciembre.
- MAHESWRAN, G.; WILLIAMS, E.G.. 1985. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. *Annals of Botany (U.S.A)* 56:619-630.

- MARTENSSON, B.; WIDELL, S. 1993. Pollen from cold-treated *Nicotiana tabacum* buds: Embryogenic capacity, peroxidase activity and partitioning in aqueous two-phase systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 141-149.
- MICHAUX-FERRIERE, N.; DUBLIN, P.; SCHWENDIMAN, J. 1987. Etude histologique de l'embryogenèse somatique á partir d'esplants foliaires de *Coffea arabica* L.. *Café, Cacao Thé* vol. XXXI, n°2 p. 103-114.
- MONTOYA, S.; CÁRDENAS-MURILLO, R. 1994. Biología de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en frutos de café de diferentes edades. *Cenicafé*, 45(1): 5-13.
- MONACO, L.C.; SONDAHL, M.R.; CARVALHO, O.J.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. 1977. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Ed. by J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag. Alemania. p. 109 - 267.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473 - 497.
- NEUENSCHWANDER, B., DUFOUR, M., BAUMANN, T. 1993. Haploid cell colony formation from mechanically isolated microspores of *Coffea arabica*. 15° Colóquio científico Internacional sobre el Café. Montpellier. ASIC p.760-762.
- NIIZEKI, H.; OONO, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *aproc. Japanese Acad.* 44, 554 - 557.
- NITSCH, J.P. 1972. Haploid plants from pollen. *Z. Pflanzenzuchtg* 67, 3 - 18.
- NITSCH, C. 1981. Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In: *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture*. Ed. by T.A. Thorpe, Academic Press. p. 241 - 252.

- NITSCH, J.P; NITSCH, C. 1970. Obtention de plantes haploides a partir de pollen. Bull. Soc. bot. Fr., 117, 339 - 360.
- NITSCH, C. ; NORREL, B. 1972. Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture. In: Genes, enzymes and populations. Vol. 2 Asbr. Ed. p. 129 - 144.
- NITSCH, C.; ANDERSEN, S.; GOARD, M.; NEUFFER, M.G.; SHERIDAN, W.F. 1981. Production of haploids plant of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In: Plants Regenerated from Tissue Culture. p. 69 - 91.
- PIERSON, E.S.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N.; STARITSKY, G. 1983. *In vitro* Development of Embryoids from Punched Leaf Discs of *Coffea canephora*. Protoplasma 115: 208 - 216. p. 208 - 216.
- PICCIRILLI, M.; ARCIONI, S. 1991. Haploid plants regenerated via anther culture in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Kock). Plant Cell Reports, 10: 273 - 276.
- RADOJEVIC, L.; KOVOOR, A. 1986. Induction of haploids. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Ed. by Y.P.S. Bajaj, Vol 1. Trees I. Springer-Verlag, Berlin, p. 65 - 86.
- RAGHAVAN, V.. 1978. Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (Henbane). American Journal of Botany, 65(9): 984-1002.
- RAGHURAMULU, Y.. 1989. Anther and endosperm culture of coffee. Journal of Coffee Research 19(2) 71 - 81.
- RAJASEKAVAN, K.; MULLINS, M.H. 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. J. Exp. Bot. 30(116): 399 - 407.
- RAJENDRA, B.; KHADEER, M.A.; SEETA, P.; ANWAR, S.Y. 1991. *In vitro* induction of androgenic haploids in Safflower (*Carthamus tinctorius* L). Plant Cell Report 10:48 - 51.

- ROCA, W.M.; NUÑEZ, V.M.; MORNAN K.. 1991. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Ed. por W.M. Roca. y L.A. Mroginski. CIAT. Cali, Colombia. p. 271 - 293.
- ROMAN, J.A.; CARDENAS, S. 1988. Paquete tecnológico para la producción de café. Ed. por J.A. Román, S. Cárdenas, Venezuela. 8: 73 - 78.
- SANGWAN-NORREEL, B.S. 1977. Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. Journal Exp. Bot. 28:843 - 852.
- SANGWAN, R.S. & SANGWAN-NORREEL, B.S. 1987. Biochemical cytology of pollen embryogenesis. International Review of Cytology, 107: 221 - 272.
- SANTANA, N. 1989. Efecto de algunos componentes del medio de cultivo sobre embriones de café (*Coffea arabica*, Lin.) cultivados *in vitro*. Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana. Vol. 1, No 4, p 53-62
- SASSER, J.N. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: Root-knot nematodes. Eds. Lamberti, F. y Taylor C.. London Academic Press p. 360-374.
- SHEN, J.H.; LI, M. F.; CHEN, Y. Q.; ZHANG, Z. H. 1983. Improving rice by anther culture. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press. Beijing, China. p. 183 - 205.
- SONDAHL, M. R. 1989. The Potential Impact of Biotechnology in Coffee. ASIC, 13 Colloque, Paipa. p. 407 - 419.
- SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. 1979. Research in *Coffea* sp. and applications of tissue culture methods. In: Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications, ed. by W. Sharp, P. Larsen, E. Paddock, V. Raghavan. p. 527-584.

- SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R.. 1991. Propagación *in vitro* del café. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Ed por W.M. Roca y L.A. Mroginski. CIAT. Cali, Colombia. p 622 - 642.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2a.ed. (1a. en español). McGraw Hill. p. 329 - 363.
- SUNDERLAND, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In: Haploids in Hogher Plants: Advances and Potential. Ed. Ken J. Kasha, University of Guelph. p. 91 - 122.
- SUNDERLAND, N. 1979. Anther and pollen culture. In: The plant genome. D.R. Davis and D.A. Hopwood Eds., England. p. 171 - 183.
- SUNDERLAND, N; WICKS, F.M. 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature, Lond. 224:1227 - 1229.
- SZAKES, E.; KOVAES, G.; PAUK, J.; BARNABAS, B. 1988. Substituti on analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports 7:127 - 129.
- TAYLOR, T., VEILLEUX, R.. 1992. Inheritance of competencies for leaf disc regeneration, anther culture, and protoplast culture in *Solanum phureja* and correlations among them. Plant Cell, Tissue Organ Culture 31: 95-103.
- TIAINEN, T.. 1992. The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports. 10:604-607.
- VASIL, K.I. 1980. Androgenetic haploids. In: International Review of Cytology. Supplement 11a. Academic Press. p. 195 - 223.

- VASIL, K.I. 1973. In: Methods and applications of tissue culture. P.F. Kruse and M.K. Patterson Edt., Academic Press, New York. p. 157 - 161.
- WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHU, C.C. 1974. On the condition for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. Acta Bot. Sinica 16:432 - 453.
- WHITE, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press. New York.
- WOLYN, D.; FENG, X.. 1993. Genotype, temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. HortScience, 28(3):216-217.
- YADAV, N.R.; SHARMA, D.R.; CHOWDHURY J.B. 1990. Regeneration of plants from cultured anthers of salt-tolerant CSR-1 rice. In: Rice Genetics II. Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. p. 695 - 696.
- YASUDA, T.; YOKO, F.; YAMAGUCHI, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* Leaf Explants by Benzyladenine. Plant Cell Physiol. 26(3): 595 - 597.
- ZAMARRIPA, A.. 1993. Etude et developpment de l'embryogenise somatique en milieu liquide en caféier (*Coffea canephora*) *C. arabica* L, et le hybride arabusta. Tesis de doctorado ENSA de RENNES p. 191.
- ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y.. 1992. Haploidy. In: Biotechnology of perennia Fruits crops, edt. by F.Hammerschlag and R.E. Litz. 550 p.
- ZHOU, C. 1988. Isolation and purification of generative cells from fresh pollen of *Vicia faba* L. Plant Cells Report 7: 107-110.
- ZUNIGA, R. 1980. Diferenciación fenotípica de algunos cafés etiopes en la colección del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Tesis M.Sc. p. 1-47.

ANEXO 1

- a. Medio de Murashige y Skoog
- | | |
|---|--------|
| - Macro elementos | mg/l |
| - NH ₄ NO ₃ | 1.650 |
| - KNO ₃ | 1.900 |
| - CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 |
| - MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 |
| - KH ₂ PO ₄ | 170 |
| - Micro elementos | mg/l |
| - H ₃ BO ₃ | 6.200 |
| - MNSO ₄ .H ₂ O | 16.900 |
| - ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.690 |
| - KI | 0.830 |
| - Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.250 |
| - CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.0250 |
| - CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.0250 |
| - Vitamimas de Murashige y Skoog (MS) | mg/l |
| - Mio-inositol | 100 |
| - Glicina | 2 |
| - Acido Nicotínico | 0.5 |
| - Piridoxina HCl | 0.5 |
| - Tiamina HCl | 0.1 |
| Hierro: | mg/l |
| - Na ₂ EDTA | 37,25 |
| - FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,85 |
| - Sacarosa | 30 g/l |
| - Gelrite | 2 g/l |
| - pH 5.8 | |
- b. Medio de Pierson
- | | |
|---------------------------|----------|
| - Macro elementos de MS/2 | |
| - Micro elementos de MS/2 | |
| - Fe EDTA | 5 ml/l |
| - Tiamina | 10 mg/l |
| - Cisteína | 50 mg/l |
| - Mio-Inositol | 100 mg/l |
| - Caseína hidrolizada | 100 mg/l |
| - 2-ip | 1 mg/l |
| - AIB | 5 mg/l |
| - Sacarosa | 30 g/l |
| - Gelrite | 2 g/l |
| - pH 5.6 | |

ANEXO 2

a. Medio de Gamborg et al (1968).

- Macro elementos de B-5:

	mg/l
- KNO ₃	2.500
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
- (NH ₄) ₂ SO ₄	134
- MgSO ₄ .7H ₂ O	250
- CaCl ₂ .2H ₂ O	150

- Micro elementos de B-5:

	mg/l
- MnSO ₄ .H ₂ O	10
- H ₃ BO ₃	3
- ZnSO ₄ .7H ₂ O	3
- Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
- KI	0.75
- CuSO ₄	0.25
- CoCl ₂ .6H ₂ O	0.25
- Hierro EDTA	mg/l
- Na ₂ EDTA	37.25
- FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
- Vitaminas de B-5	
	mg/l
- Ácido nicotínico	1
- Tiamina	10
- Piridoxina	1
- Mio-Inositol	100
- Sacarosa	20 g/l
- Gelrite	2 g/l
- pH 6	

b. Medio de Yasuda

- Macro elementos de Yasuda:	mg/l
- Micro de MS/4	
KH ₂ PO ₄	42,5
- Micro elementos de Yasuda:	
H ₃ BO ₃	3,1
MnSO ₄ .7H ₂ O	11,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,3
NaMO ₄ .2H ₂ O	0,125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05
Fe EDTA/2- Tiamina	10ml/l
Inositol	100 g/l
Piridoxina	1 mg/l
Ác. nicotínico	1 mg/l
B.A.P.	1,12 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Gelrite	2 g/l
pH 5.6	

ANEXO 3

a. Medio de Ascanio I

- Macroelementos de Murashige y Skoog 20x=50ml/L

	mg/l
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170

- Microelementos de Murashige y Skoog

	mg/l
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ .7H ₂ O	16.900
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.690
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0250
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0250

- Sacarosa	30 g/l
- Mio-inositol	100 mg/l
- Tiamina-HCl	10 mg/l
- Cisteína	30 mg/l
- Ácido naftalen acético	2 mg/l
- Bencil amino purina	0.5 mg/l
- Gelrite	2 mg/l
- pH 5,8	

b.

FAA

Formalina	100 ml
Alcohol 95%	500 ml
Ác. Acético	50 ml
Agua	350 ml

ANEXO 4

a. Colorante de Alexander

Etanol absoluto	10 ml
Verde malaquita (1% en etanol 95%)	1 ml
Agua destilada	50 ml
Glycerol	25 ml
Fuccina ácida	5 ml
Orange green (1% en agua)	0.5 ml
Ácido acético glacial	1-4 ml
Fenol	5 g
Hidrato de Cloral	5 g

b. Aceto Carmín

Carmin	1 g
ácido acético glacial al 45%	100 ml

c. Colorante Iodo yoduro

Ioduro de potasio	2
Iodo	1
H ₂ O destilada	100

d. Cuádruple Coloración

Xileno	10 minutos
Xileno	10 "
Xileno-alcohol	5 "
Alcohol 100%	3 "
Alcohol 95%	3 "
Alcohol 70%	3 "
Safranina	30 "
Agua	30 segundos
Violeta cristal	90 "
Alcohol absoluto	90 "
Alcohol 100%	90 "
Aceite de clavo+orange green+ fast green	2 minutos
Aceite de clavo + orange green	2 "
Aceite de clavo + orange green	2 "
Aceite de clavo + orange green	2 "
Xileno alcohol	5 "
Xileno	5 "
Xileno	5 "
Xileno	5 "

CIRAD (1989)

ANEXO 5

a. Proceso de Deshidratación

FAA	48 horas
Alcohol 50%	1 hora
Alcohol 70%	1 "
Alcohol 80%	1 "
Alcohol 90%	1 "
Alcohol 95%	1 "
Alcohol 50%	1 "
Alcohol 100%	1 "
Alcohol 100%	1 "
Alcohol + Tolueno 1:1	1/2 "
Tolueno puro	1 "
Tolueno puro	1 "
Tolueno parafina 1:1	1/2 "
Parafina	1 "
Parafina	1 "
Parafina	1 "

CIRAD (1989)

b. Composición iónica en meq/l de las soluciones minerales utilizadas.

Iones	Murashige y Skoog	Gamborg B-5
NO ₃ -	39.4	25.0
H ₂ PO ₄ -	1.3	1.1
SO ₄ -	3.0	4.0
Cl -	6.0	2.0
K +	20.1	25.0
NH ₄ +	20.6	2.0
Na +	--	1.1
Ca ++	6	2.0
Mg ++	3	2.0

Total iones (µm)	93.3	60.2
------------------	------	------

Balance de nitrogeno NO ₃ -/NH ₄ +	1.91	12.50
---	------	-------

Según Boccon-Gibod (1989).