

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DEL CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES INMADUROS
DE *Coffea arabica* L.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar el grado de

Magister Scientiae

por

JOSE ELIAS TREVIÑO RAMIREZ

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION VEGETAL
Turrialba, Costa Rica
1986

DEDICATORIA

A Dios gracias

Con todo mi amor a mi esposa:

Silvia

Y a nuestros hijos:

Silvia Gabriela y José Elías

por su comprensión, colaboración
y amor de siempre.

A mis padres José Edmundo y Lucila

A mi hermana Ruth Miriam

con amor y agradecimiento por su
cariño y apoyo

Al hombre del campo

objetivo de nuestros esfuerzos.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de sus agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. Gustavo A. Enríquez, Consejero Principal, por su constante y acertada orientación, estímulo y cooperación en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Ludwig Müller por su orientación y constante apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

Al M. Sc. Jorge Echeverri por su decidida cooperación y atinadas sugerencias en el transcurso de mis estudios e investigación.

A los Drs. José Fargas, Marciano Rodríguez y Marc Berthouly por la revisión del trabajo y valiosas sugerencias.

Al Dr. Francisco Di Stefano, Director del Programa de Posgrado por sus valiosas sugerencias en el escrito del texto final.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo económico brindado para la realización de los estudios.

Al M. C. Ramón Guajardo Q. por su apoyo constante, en la superación académica de los maestros de la F.A.U.A.N.L.

Al M. Sc. Fermín Montes Carazos por su valioso apoyo en la terminación de mis estudios.

Al Programa Regional para la Protección y Mejoramiento de la Caficultura de México, Centroamérica, Panamá y República Dominicana por su ayuda financiera en la realización de la tesis.

Al Dr. José J. Galindo por su colaboración en la traducción del Resumen al idioma inglés.

Al personal del Departamento de Producción Vegetal especialmente a los señores: Dr. Romeo Martínez, M Sc. José Arce y Luis Torres por la valiosa colaboración brindada.

A la familia Rodríguez Portuguez por brindarme su amistad y cariño de siempre.

A la familia Portuguez Quirós por su valiosa amistad en mi estancia en Turrialba.

Al excelente profesional y amigo, Ing. Agr. Jorge Arturo Sandoval Fernández por su constante apoyo y sugerencias.

A los Ings. Luis Fernando Avendaño y Humberto Gómez P. por su valiosa amistad y cooperación en el trabajo de campo.

A los Ings. Nidia Guzmán y Alberto Berrios por sus valiosas sugerencias en el trabajo de laboratorio y amistad.

A María Mayela Alvarado y Emilce Chavarría por el interés y entusiasmo en el mecanografiado del texto.

A los señores Mauricio Argueta R. y Emilio Ortiz C. por su habilidad para el dibujo técnico.

Al personal que labora en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, PROMECAFE-CATIE, Oficina de Posgrado, Biblioteca Conmemorativa Orton y Cómputo del CATIE por su valiosa ayuda y amistad.

A mis compañeros de promoción y de las promociones 84-86 y 85-87 por su sincera amistad y por los gratos e inolvidables momentos compartidos.

BIOGRAFIA

El autor nació en Monterrey, Nuevo León, México en mayo de 1955. Realizó sus estudios de secundaria en la Escuela Secundaria N° 5 "Profesor Macario Pérez C." en Monterrey, N. L.

Sus estudios universitarios los realizó en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, graduándose de Ingeniero Agrónomo con la especialidad de Fitotecnia en 1977.

De 1977 a 1980 trabajó como extensionista agrícola en cultivos perennes tropicales y supervisor de créditos dependiente del Banco de Crédito Rural del Golfo, ubicado en Córdoba, Veracruz, México.


De 1980 a 1983 se vinculó a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León como profesor de las materias Cultivos Tropicales y Cultivos Industriales.

En marzo de 1983 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, en Turrialba, Costa Rica, donde obtuvo el grado de *Magister Scientiae* en setiembre de 1986.

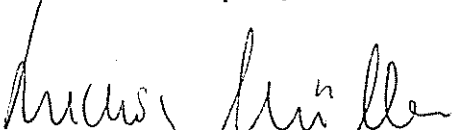
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito para optar al grado de

Magister Scientiae

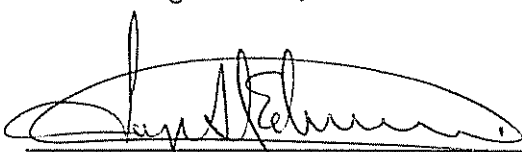
JURADO:



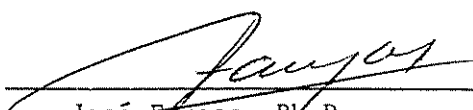
Gustavo A. Enríquez, Ph.D. Profesor Consejero




Ludwig Müller, Ph.D. Miembro del Comité




Jorge H. Echeverri, M.Sc. Miembro del Comité



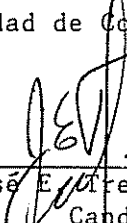
José Fargas, Ph.D. Miembro del Comité



José Fco. Di Stefano G., Ph.D.
Director del Programa de Estudios de Posgrado
en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales, URC-CATIE



Luis Estrada Navas, Ph.D.
Decano, Sistema de Estudios de Posgrado de
la Universidad de Costa Rica.



José E. Arceviño Ramírez
Candidato

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xiv
LISTA DE CUADROS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xxii
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos fundamentales del cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros.....	4
2.1.1 Germinación precoz y su control.....	4
2.1.2 El uso de hormonas del crecimiento.....	6
2.1.3 Pasos a seguir para el aislamiento exitoso de em- briones inmaduros.....	9
2.1.4 Función del suspensor.....	11
2.2 Aplicaciones prácticas del cultivo <u>in vitro</u> de embriones	12
2.3 Componentes básicos de los medios de cultivo para culti- var <u>in vitro</u> tejidos y órganos.....	13
2.3.1 Requerimientos básicos de los medios de cultivo para cultivar <u>in vitro</u> embriones de plantas.....	14
2.3.1.1 Medio basal (sales minerales).....	16
2.3.1.2 Carbohidratos.....	17
2.3.1.3 Fuentes nitrogenadas.....	18
2.3.1.4 Otros suplementos.....	19
2.4 Desinfección de frutos y semillas previo a la escisión de embriones.....	20
2.4.1 Desinfección de frutos y semillas de café.....	22
2.5 Cultivo <u>in vitro</u> de tejidos y órganos de cafeto.....	23
2.5.1 Cultivo <u>in vitro</u> de embriones maduros.....	24

2.6	Morfología de embriones en diferentes etapas de su embriogénesis (considerando plantas dicotiledóneas).....	30
2.7	Estudio sobre desarrollo del embrión y endosperma de caféto.....	31
3.	MATERIALES Y METODOS.....	38
3.1	Descripción del área experimental.....	38
3.2	Material experimental.....	38
3.2.1	Materiales provenientes de floración normal.....	38
3.2.2	Materiales provenientes de hibridación intervarietal y autofecundación.....	39
3.3	Metodología del experimento.....	39
3.3.1	Etapas del experimento.....	39
3.3.2	Preparación de medios de cultivo.....	41
3.3.3	Metodología para el aislamiento y cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café.....	43
3.3.3.1	Desinfección de frutos.....	43
3.3.3.2	Escisión de frutos y aislamiento y cultivo <u>in vitro</u> en embriones.....	44
3.4	Diseño experimental.....	47
3.5	Registro de la información.....	48
3.5.1	Variables medidas en el fruto.....	48
3.5.2	Variables medias en el embrión.....	49
3.6	Análisis de la información.....	50
3.6.1	Análisis de varianza.....	50
3.6.1.1	Modelo estadístico.....	51
3.6.2	Prueba de Duncan.....	53
3.6.3	Histogramas.....	53
4.	RESULTADOS.....	54
4.1	Evaluación del efecto de nueve medios de cultivo en seis diferentes edades de embriones de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308.....	54
4.1.1	Cuarta edad de aislamiento y cultivo (16 semanas después de la floración).....	54
4.1.2	Quinta edad de aislamiento y cultivo (18 semanas después de la floración).....	60

4.1.3	Sexta edad de aislamiento y cultivo (20 semanas después de la floración).....	65
4.1.4	Séptima edad de aislamiento y cultivo (22 semanas después de la floración).....	71
4.1.5	Octava edad de aislamiento y cultivo (24 semanas después de la floración).....	77
4.1.6	Novena edad de aislamiento y cultivo (26 semanas después de la floración).....	85
4.2	Evaluación del efecto de 10 medios de cultivo, en embriones inmaduros de 22 semanas de edad, provenientes de cruzas intervarietales y autofecundación (Experimento ED-4 de PROMECAFE).....	91
4.2.1	Cruza 1.....	92
4.2.2	Cruza 2.....	94
4.2.3	Cruza 3.....	96
4.2.4	Cruza 4.....	98
4.2.5	Cruza 5.....	98
4.2.6	Cruza 6.....	101
4.2.7	Autofecundación.....	103
4.3	Evaluación del efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de 22 semanas de edad, provenientes de cruzas intervarietales (Finca Comercial de Café del CATIE).....	105
4.3.1	Cruza 1.....	105
4.3.2	Cruza 2.....	105
4.4	Clasificación de las formas y tamaños de los embriones observados por edad.....	109
4.5	Observaciones sobre las variables medidas en los frutos de café.....	113
4.5.1	Longitud, ancho mayor y ancho menor de frutos.....	113
4.5.2	Volumen.....	115
4.5.3	Peso fresco y peso seco.....	117
4.6	Contaminación.....	119
5.	DISCUSION.....	121
5.1	Evaluación del efecto de 9 medios de cultivo en seis diferentes edades de embriones de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308.....	121
5.1.1	Cuarta y quinta edades de aislamiento y cultivo (16 y 18 semanas después de la floración).....	121

	Página
5.1.2 Sexta edad de aislamiento y cultivo (20 semanas después de la floración).....	129
5.1.3 Séptima edad de aislamiento y cultivo (22 semanas después de la floración).....	137
5.1.4 Octava edad de aislamiento y cultivo (24 semanas después de la floración).....	138
5.1.5 Novena edad de aislamiento y cultivo (26 semanas después de la floración).....	140
5.2 Evaluación del efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de 22 semanas de edad, provenientes de cruzas intervarietales y autofecundación (Experimento ED-4 de PROMECAFE).....	142
5.2.1 Cruza 1.....	142
5.2.2 Cruza 2.....	143
5.2.3 Cruza 3.....	143
5.2.4 Cruza 4.....	143
5.2.5 Cruza 5.....	143
5.2.6 Cruza 6.....	144
5.2.7 Autofecundación.....	144
5.3 Evaluación del efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de 22 semanas de edad, de cruzas intervarietales (Finca comercial de café del CATIE).....	145
5.3.1 Cruza 1.....	145
5.3.2 Cruza 2.....	145
5.4 Clasificación de las formas y tamaños de los embriones encontrados por edad.....	145
5.5 Contaminación.....	146
6. CONCLUSIONES.....	147
7. RECOMENDACIONES.....	150
8. LITERATURA CITADA.....	153
9. APENDICE.....	161

TREVIÑO, J. E. Estudio del cultivo in vitro de embriones inmaduros de *Coffea arabica* L. Tesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE, 1986.

Palabras claves: café (*Coffea arabica* L.), cultivo in vitro, características fenotípicas, embriones inmaduros, medios de cultivo.

RESUMEN

La presente investigación se realizó entre febrero y noviembre de 1984, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE - PROMECAFE, Turrialba, Costa Rica. Los objetivos generales fueron: 1) determinar si es posible obtener plántulas a partir de embriones inmaduros cultivados in vitro; 2) desarrollar una metodología que permita el aislamiento y cultivo in vitro de embriones inmaduros de café. Los objetivos específicos fueron: 1) determinar desde que edad del embrión cultivado in vitro pueden desarrollar plántulas normales; 2) encontrar en que medio de cultivo y con qué material genético se obtienen los mejores resultados; 3) determinar la aplicabilidad del cultivo in vitro de embriones inmaduros, para multiplicar plantas de híbridos F_1 provenientes de cruces intervarietales de la especie *C. arabica* L., 4) estudiar si hay relación entre las características fenotípicas de los frutos inmaduros utilizados (volumen, ancho mayor, ancho menor, longitud, etc.) y la forma y tamaño de los embriones encontrados.

El trabajo de aislamiento y cultivo in vitro de embriones inmaduros se hizo con las variedades CATIMOR T8664 y CATURRA T2308 y sus respectivos cruces, en la floración del 12 de marzo de 1984.

Los medios de cultivo utilizados tuvieron un medio basal en común denominado Murashige y Skoog, así como otros suplementos tales como: sacarosa al tres por ciento, agar al 0,7 por ciento, tiamina 4 mg/l, mio-inositol

100 mg/l y Fe EDTA 5 mg/l. Sobre toda la mezcla anterior se hicieron diferentes preparaciones con los reguladores del crecimiento BAP (bencilaminopurina) en tres concentraciones (0, 1 y 2 mg/l) e IAA (ácido indolacético) en tres concentraciones (0; 0,2 y 0,4 mg/l); con la combinación de estas fitohormonas se elaboraron nueve medios de cultivo.

Se consideraron nueve edades de embriones (de la 10° a la 26° semana después de la floración), de las cuales sólo en cinco se encontraron embriones inmaduros y en una embriones maduros.

Las variables medidas en las plántulas provenientes de embriones fueron: 1) tamaño y forma del embrión al momento del aislamiento, 2) porcentaje de supervivencia, 3) longitud de plántula, 4) diámetro del caulículo, 5) diámetro de hojas cotiledonares, 6) vigor, 7) porcentaje de plántulas con raíces y 8) porcentaje de contaminación.

Se realizaron análisis de varianza y pruebas de Duncan al cinco por ciento para la mayoría de las variables mencionadas y por edad de aislamiento.

Se encontró un crecimiento de plántulas a partir de los embriones inmaduros y maduros de café cultivados in vitro, dependiente de la edad del embrión y de los constituyentes del medio de cultivo.

La metodología desarrollada para aislar y cultivar in vitro embriones inmaduros, demostró ser eficiente, considerando el porcentaje de supervivencia y el porcentaje de contaminación por edad. Se encontró germinación precoz en los embriones inmaduros cultivados in vitro con 16 y 18 semanas de edad (edades 4 y 5). Hay un desarrollo normal de plántulas de café a partir de embriones inmaduros aislados a las 20, 22 y 24 semanas después

de la floración (edades 6, 7 y 8).

Fue posible hacer el cultivo in vitro de embriones inmaduros de híbridos F_1 provenientes de cruces intervarietales de la especie *C. arabica* L., de 22 semanas de edad, pues se obtuvo un crecimiento y desarrollo normal de plántulas. El medio de cultivo 7 (medio basal más suplementos más 2,0 mg/l de BAP y 0 mg/l de IAA) fue el que dió los mejores resultados en las edades 6 y 7, ya que en las edades 8 y 9 no hubo una clara tendencia para señalar un medio de cultivo sobresaliente.

Se encontró una relación diferencial de cada variedad, entre las características fenotípicas observadas en los frutos inmaduros cosechados por edad y la forma y tamaño de los embriones encontrados.

TREVIÑO, J. E. Study of the in vitro culture of immature embryos of *Coffea arabica*, L. Master of Science Thesis, Turrialba, Costa Rica, UCR-CATIE, 1986.

Key words: coffee (*Coffea arabica* L.), in vitro culture, phenotypical characteristics, immature embryos, culture medium.

SUMMARY

The present research was carried out between February and November, 1984 in the Tissue Cultures Laboratory of CATIE-PROMECAFE, Turrialba, Costa Rica. The general objectives were: 1) to determine if it is possible to obtain seedlings from immature embryos cultivated in vitro; 2) to develop a methodology that permits the isolation in vitro culture of immature coffee embryos. The specific objectives were: 1) to determine from what age the embryo cultivated in vitro can develop normal seedlings; 2) to find in which culture medium and with what genetic material the best results are obtained; 3) to determine the applicability of the in vitro culture of immature embryos, to multiply hybrid F₁ plants coming from intervarietal crosses of *C. arabica* L. species; 4) to study if there is any relation between the phenotypical characteristics of the immature fruits utilized (volume, greatest width, least width, length, etc.) and the shape and size of the embryos found.

The work of isolating and in vitro cultivating of immature embryos was done with the CATIMOR T 8664 and CATURRA T 2308 varieties and their respective crosses in the flowering of March 12, 1984.

The culture media used had a common basal medium named Murashige y Skoog, as well as other supplements such as: sucrose at 3 %, agar at 0.7 %, thiamine 4 mg/l, myo-inositol 100 mg/l and Fe EDTA 5 mg/l.

Different preparations were made on all of the aforementioned mix with growth regulators BAP (benzylaminopurine) in three concentrations (0, 1 and 2 mg/l) and IAA (indoleacetic acid) in three concentrations (0, 0.2 and 0.4 mg/l); nine culture media were elaborated using a combination of phytohormones.

Nine embryo ages were considered (from the 10th to the 26th week after flowering), of which immature embryos were found in only five and mature embryos in one.

The variables measured in the seedling coming from embryos were: 1) size and shape of the embryo at the moment of isolation; 2) percentage of survival; 3) length of seedling; 4) diameter of the cauliculus; 5) diameter of the cotyledonary leaves; 6) vigour; 7) percentage of seedlings with roots; and 8) percentage of contamination.

Analysis of variance and Duncan tests at 5 % were done for the majority of the variables mentioned and for the age of isolation.

A growth of the seedlings from immature and mature embryos of coffee cultivated in vitro was found, depending on the age of the embryo and the constituents of the culture medium.

The methodology developed to isolate and cultivate immature embryos in vitro, was shown to be efficient, considering the survival percentage and the percentage of contamination per age. Early germination was found in the immature embryos cultivated in vitro with 16 and 18 weeks of age (ages 4 and 5). There is a normal development of coffee seedlings coming from immature embryos isolated at 20, 22 and 24 weeks after flowering (ages 6, 7 and 8).

It was possible to do the in vitro culture of immature embryos of F₁ hybrids coming from intervarietal crosses of the *C. arabica* L. species,

of 22 weeks of age, and a normal seedling growth and development were obtained. The culture medium 7 (basal medium plus supplements plus 2.0 mg/l of BAP and 0 mg/l of IAA) gave the best results in the ages 6 and 7, since there was no clear tendency to show a culture medium that stands out in the ages 8 and 9.

A differential relation of each variety was found, between the phenotypical characteristics observed in the immature fruits harvested by age and the shape and size of the embryos found.

LISTA DE CUADROS

En el texto Cuadro N°		Página
1	Estados de desarrollo en la embriogénesis zigótica de <i>Capsella</i>	30
2	Descripción de los cruces realizados en la presente investigación.....	40
3	Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares y porcentaje de plántulas con raíces, para los efectos de A (IAA), B (BAP) y variedad (Var. 1= CATIMOR T 8664 y Var. 2= CATURRA T 2308), en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> durante la 4ª edad de aislamiento y cultivo.....	55
4	Comparación de los promedios de las variedades porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 9 medios de cultivo en embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 (Var. 1) y CATURRA T 2308 (Var. 2), cultivados <u>in vitro</u> durante la 4ª edad de aislamiento y cultivo.....	56
5	Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para los efectos de A (IAA), B (BAP) y variedad (Var. 1= CATIMOR T 8664 y Var. 2= CATURRA T 2308), en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> durante la 5ª edad de aislamiento y cultivo.....	61
6	Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 9 medios de cultivo en embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 (Var. 1) y CATURRA T 2308 (Var. 2), cultivados <u>in vitro</u> durante la 5ª edad de aislamiento y cultivo.....	62

- 7 Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para los efectos de A (IAA), B (BAP) y variedad (Var. 1= CATIMOR T 8664 y Var. 2= CATURRA T 2308), en embriones inmaduros de café cultivados in vitro durante la 6ª edad de aislamiento y cultivo..... 66
- 8 Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 9 medios de cultivo en embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 (Var. 1) y CATURRA T 2308 (var. 2), cultivados in vitro durante la 6ª edad de aislamiento y cultivo..... 67
- 9 Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces; para el efecto de 9 medios de cultivo en embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 (Var. 1) y CATURRA T 2308 (Var. 2), cultivados in vitro durante la 7ª edad de aislamiento y cultivo..... 72
- 10 Comparación de promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para los efectos de A (IAA), B (BAP) y variedad (Var. 1= CATIMOR T 8664 y Var. 2= CATURRA T 2308), en embriones inmaduros de café cultivados in vitro durante la 7ª edad de aislamiento y cultivo. 74
- 11 Comparación de promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro de caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para los efectos de A (IAA), B (BAP) y variedad (Var. 1= CATIMOR T 8664 y Var. 2= CATURRA T 2308), en embriones inmaduros de café cultivados in vitro durante la 8ª edad de aislamiento y cultivo. 79

12	Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 9 medios de cultivo en embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 (Var. 1) y CATURRA T 2308 (Var. 2), cultivados <u>in vitro</u> durante la 8ª edad de aislamiento y cultivo.....	80
13	Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para los efectos de A (IAA), B:(BAP) y variedad (Var. 1= CATIMOR T 8664 y Var. 2= CATURRA T 2308), en embriones maduros de café cultivados <u>in vitro</u> durante la 9ª edad de aislamiento y cultivo.....	86
14	Comparación de los promedios de las variables porcentaje de supervivencia, longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 9 medios de cultivo en embriones maduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 (Var. 1) y CATURRA T 2308 (Var. 2), cultivados <u>in vitro</u> durante la 9ª edad de aislamiento y cultivo.....	87
15	Comparación de los promedios de las variables longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> 22 semanas después de la floración de las cruces 1 y 2 (Cuadro 2) realizadas en el Experimento ED-4 de PROMECAFE.....	93
16	Comparación de los promedios de las variables longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> 22 semanas después de la floración de las cruces 3 y 5 (Cuadro 2) realizadas en el Experimento ED-4 de PROMECAFE.....	97

17	Resultados de las variables medidas en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> 22 semanas después de la floración, de la cruza 4 (Cuadro 2) realizada en el Experimento ED-4 de PROMECAFE.....	99
18	Comparación de promedios de las variables longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces, para el efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> 22 semanas después de la floración, de la cruza 6 y la autofecundación 1 (Cuadro 2) realizadas en el Experimento ED-4 de PROMECAFE.....	102
19	Resultados de las variables medidas en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> 22 semanas después de la floración, de la cruza 1 (Cuadro 2) realizada en la Finca comercial de café del CATIE.....	106
20	Comparación de los promedios de las variables longitud de plántula, diámetro del caulículo, diámetro de hojas cotiledonares, vigor y porcentaje de plántulas con raíces; para el efecto de 10 medios de cultivo en embriones inmaduros de café cultivados <u>in vitro</u> 22 semanas después de la floración, de la cruza 2 (Cuadro 2) realizada en la finca comercial de café del CATIE.....	108
21	Resultados en porcentaje de contaminación (hongos y bacterias) observada por edad de aislamiento y cultivo <u>in vitro</u> de embriones.....	120

En el Apéndice

1A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, 4ª edad de aislamiento de la evaluación con 9 medios de cultivo.....	162
2A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, 5ª edad de aislamiento de la evaluación con 9 medios de cultivo.....	163

3A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, 6ª edad de aislamiento de la evaluación con 9 medios de cultivo.....	164
4A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, 7ª edad de aislamiento de la evaluación con 9 medios de cultivo.....	165
5A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, 8ª edad de aislamiento de la evaluación con 9 medios de cultivo.....	166
6A	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones maduros de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, 9ª edad de aislamiento de la evaluación con 9 medios de cultivo.....	167
7A.	Cuadrados medios, coeficientes de variación y significancia de las variables estudiadas en el cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de café de 22 semanas de edad, provenientes de las cruces intervarietales y autofecundación realizadas en el experimento ED-4 de PROMECAFE y la finca comercial de café del CATIE.....	168
8A	Componentes del medio basal de cultivo de Murashige y Skoog.....	169
9A	Promedios de las variables (longitud, ancho mayor, ancho menor, volumen, peso fresco y peso seco), medidas en los frutos de las variedades CATIMOR T 8664 (V1) y CATURRA T 2308 (V2) durante cada muestreo de frutos previo al aislamiento y cultivo <u>in vitro</u> de embriones. Inicio de muestreos a las 10 semanas después de la floración del 12 de marzo de 1984, terminación de muestreos a las 30 semanas después de la floración.....	170

LISTA DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Partes de la planta de cafeto utilizadas en cultivo <u>in vitro</u> de tejidos y órganos.....	25
2	Fases de desarrollo de las semillas de café (Var. Típica) de los 90 días después de la fecundación hasta los 150 días, etapa previa a su madurez.....	34
3	Cortes de semillas de café (<i>Coffea arabica</i> L.).....	36
4	Representación esquemática de embriones maduros e inmaduros de café (<i>Coffea arabica</i> L.) de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, de formas y longitudes observadas en las 6 diferentes etapas de muestreo.....	112
5	Curvas de crecimiento de longitud, ancho mayor y ancho menor de fruto de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308 considerando 11 edades de muestreo.....	114
6	Curvas de crecimiento de volumen del fruto de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, considerando 11 edades de muestreo.....	116
7	Curvas de crecimiento de peso fresco y peso seco del fruto de café de las variedades CATIMOR T 8664 y CATURRA T 2308, considerando 11 edades de muestreo.....	118
8	Variable longitud de plántula, de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATIMOR T 8664 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	123
9	Variable longitud de plántula de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATURRA T 2308 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	124
10	Variable diámetro del caulículo de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATIMOR T 8664 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	125
11	Variable diámetro del caulículo de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATURRA T 2308 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	126

Figura N°		Página
12	Variable diámetro de hojas cotiledonares de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATIMOR T 8664 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	127
13	Variable diámetro de hojas cotiledonares de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATURRA T 2308 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	128
14	Variable porcentaje de supervivencia de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATIMOR T 8664 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	131
15	Variable porcentaje de supervivencia de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATURRA T 2308 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	132
16	Variable vigor de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATIMOR T 8664 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	133
17	Variable vigor de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATURRA T 2308 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	134
18	Variable porcentaje de plántulas con raíces de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATIMOR T 8664 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	135
19	Variable porcentaje de plántulas con raíces de embriones inmaduros y maduros de café, variedad CATURRA T 2308 en seis edades embrionarias bajo la influencia de nueve medios de cultivo.....	136
20	Pasos generales a seguirse para el aislamiento y cultivo <u>in vitro</u> de embriones inmaduros de cafeto.....	152