

RELACION ENTRE LAS CARACTERISTICAS ESTOMATICAS Y EL NUMERO CROMOSOMICO DE UN HIBRIDO INTERESPECIFICO EN CAFE*

Francisco Javier Orozco C. **
Clímaco Cassalet D. ***

INTRODUCCION

En los trabajos sobre mejoramiento del cafeto, que se llevan a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, se ha dado especial importancia a la utilización de la resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*) que se encuentra en colecciones de *Coffea arabica* y en especies diferentes a las cultivadas en el país. Una fuente de material con características más amplias de resistencia a las presentadas por el *C. arabica* (tetraploide), son las especies diploides. Dentro de este campo se han efectuado cruzamientos entre árboles de las especies *C. canephora* y *C. arabica*, tendientes a conocer el comportamiento de los híbridos y explorar las técnicas de producción y manejo de los mismos.

A través de estos cruzamientos, se busca obtener árboles que combinen la resistencia a las razas de roya conocidas, presente en plantas de *C. canephora* (2), y las características fenotípicas de *C. arabica*.

En general, el proceso de selección en material de híbridos interespecíficos es dispendioso. Es necesario estudiar una población numerosa para poder encontrar un individuo que reúna la mayoría de caracteres favorables. En plantas perennes como el café, este proceso es mucho más lento. Es conveniente por tanto, tratar de encontrar métodos que permitan seleccionar tempranamente los árboles híbridos que se acerquen más al genotipo deseado. Con este fin se podría recurrir, entre otros factores, al exámen de características anatómicas que se han relacionado frecuentemente con el número de cromosomas, tales como, el número de estomas por unidad de área (7) y el número de cloroplastos en las células guardas de los estomas (8, 15), buscando con ellas identificar los individuos que más se acerquen al genotipo ideal.

* Adaptación de una parte de la Tesis de grado presentada por el autor principal para optar al Título de Magister Scientiae en el Programa de Estudios para Graduados UN-ICA, Bogotá, Colombia.

** Asistente de la Sección de Fitomejoramiento del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe, Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Subgerente de Investigación del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, Bogotá, Colombia.

En cuanto al número de estomas por unidad de área, varios investigadores (7, 16, 17, 19), han encontrado que la cantidad de estomas decrece cuando el número de cromosomas aumenta, en especies de *Coffea*. Es posible también, que exista una relación entre el tamaño de los estomas y el número cromosómico, como la encontrada por Williams (19) en un híbrido triploide de *C. canephora* x *C. arabica*.

Con respecto al número de cloroplastos de las células guardas, se ha encontrado en especies diferentes al café, una relación directa con el número cromosómico (3, 8, 15). Howard (8) afirma, que el grado de ploidía de las plántulas de papa, puede determinarse rápidamente mediante el conteo de los cloroplastos en las células de los estomas de las primeras hojas.

El hecho de que las características mencionadas, número de estomas y de cloroplastos en las células guardas, sean constantes en una especie, da un amplio margen de seguridad a la utilización de este método para identificar híbridos entre especies y obtener, indirectamente, el número de cromosomas de una planta (19), cuando se han determinado plenamente los patrones de correlación para cada característica.

El presente estudio, se realizó con el objeto de determinar las relaciones que existen entre el número de cromosomas de materiales provenientes de cruzamientos hechos en Cenicafé, entre *C. arabica* y *C. canephora*, y la cantidad y tamaño de los estomas y los cloroplastos de las células guardas. El conocimiento de estas relaciones servirá para acelerar el proceso de selección de plantas en los trabajos de mejoramiento.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron muestras recolectadas en los siguientes grupos de árboles:

Progenitores: árboles de las especies *C. arabica*, L. Cultivar Caturra. ($2n = 44$) y *C. canephora* P. ex Fr ($2n = 22$).

Híbridos triploides: ($2n = 33$), producto del cruzamiento de las dos especies.

Híbrido hexaploide: ($2n = 66$), obtenido mediante la duplicación de los cromosomas de un árbol híbrido triploide.

Progenie del híbrido triploide: procedente de la polinización libre de estos híbridos.

Progenie del híbrido duplicado (hexaploide).

Retrocruzamientos de la progenie del híbrido triploide a la especie *C. arabica*, var. Caturra.

Retrocruzamientos del híbrido hexaploide a la especie *C. arabica* var. Caturra.

En el apéndice 1, se registra el total de árboles utilizados y su genealogía.

Las plántulas de cada progenie se habían seleccionado en almácigo, por su semejanza fenotípica con *C. arabica*.

Todo el material se recolectó en el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) en Chinchiná (Caldas) Colombia, a 1.310 metros sobre el nivel del mar, 20°C y 2.400 mm de precipitación anual.

Los trabajos de laboratorio se efectuaron en el Centro Experimental (Tibaitatá) del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), ubicado en Mosquera (Cundinamarca).

Para el conteo del número de cromosomas, se hicieron germinar semillas de cada uno de los árboles en cajas de Petri a luz difusa. Cuando las raicillas tenían aproximadamente un centímetro de longitud, se cortaron los ápices radiculares y se siguió la metodología propuesta por Mendes (14) así: tratamiento durante cuatro horas en una solución saturada de paradiclorobenceno; fijación en carnoy (tres partes de alcohol absoluto y una parte de ácido acético glacial) por un tiempo mínimo de doce horas o más si se conserva en refrigerador; hidrólisis en ácido clorhídrico al 10 o/o, a 60°C, durante dos minutos; lavado con agua destilada, lavado con ácido acético de 45 o/o durante algunos minutos y aplastamiento en orceína acética.

Para determinar la hora más adecuada de iniciación del tratamiento se hicieron cortes cada media hora, a partir de las 8 a. m.

El conteo de estomas se efectuó sobre impresiones obtenidas usando barniz para uñas. El método consiste en limpiar la hoja con un paño o tela húmeda y aplicar barniz para uñas en una faja de un centímetro de ancho por 3 centímetros de largo, aproximadamente. Después de diez minutos se retira la película con una pinza, y se monta en placas con glicerina acidificada, al 50 o/o o se conserva en bolsitas de celofán o celuloide, previamente marcadas. Estas pueden conservarse por varios meses sin sufrir deterioros.

Las impresiones se hicieron sobre el segundo par de hojas plenamente desarrolladas, contando desde el ápice de la rama, en ramas situadas en la parte media del árbol, y sobre la mitad de la hoja. Este sistema permite hacer el estudio sin desprender ni deteriorar las hojas.

Se contó el número de estomas en diez campos por placa con un área por campo de 0,0641 milímetros cuadrados y luego se calculó el número de estomas por milímetro cuadrado.

Las impresiones hechas sobre hojas con productos naturales o sintéticos, no permiten rea-

lizar medidas precisas de la longitud y la anchura de las células guardas de los estomas, al menos en la variedad caturra de *C. arabica*, ya que la epidermis de la hoja no presenta un relieve bien definido, especialmente en la región en donde las células guardas se unen a las células subsidiarias o anexas. Por esta razón, las medidas se hicieron sobre epidermis previamente separadas de las hojas y montadas en gotas de agua destilada.

Se midió la longitud y la anchura del par de células guardas en micras, en 20 estomas cerrados por placa, utilizando un aumento de 400 X. Con base en estas medidas se determinó el área del rectángulo que circunscribe el estoma y el índice de cada estoma o relación ancho sobre largo. El primero ($L \times A$), da una idea del tamaño del estoma y el segundo (A/L) permite apreciar la forma.

La epidermis del envés de la hoja, previamente separada y lavada para eliminar cualquier tipo de tejido o de impurezas, se tiñó con nitrato de plata ($AgNO_3$) en solución del 1 o/o, y se montó en una gota de agua. Se contó el número total de cloroplastos en las dos células guardas de 20 estomas por planta (15). Se contó además el número de plastidios en las células acompañantes.

En algunos casos estas placas se utilizaron además para medir las células guardas de los estomas.

RESULTADOS

Las técnicas de preparación y tinción de cromosomas usadas por los investigadores brasileños (11, 13, 14), dieron material adecuado para hacer las observaciones, como se puede observar en las figuras 1 y 2. Todos los árboles produjeron semillas, la mayoría de las cuales al germinar presentaban aproximadamente 44 cromosomas en sus raíces, a excepción de *C. canephora*. Solamente el híbrido duplicado (árbol M-33) y su progenie, produjeron en proporción muy baja, plántulas con 55 cromosomas, indicando el carácter hexaploide de sus progenitores al producir gametos con 33 cromosomas, los que al unirse con gametos de 22 cromosomas bien sea del mismo árbol ó de los tetraploides ($2n = 44$) que los rodean, originarían las plántulas con 55 cromosomas.

En el árbol M-830, proveniente del híbrido duplicado, no se encontró ninguna plántula con 55 cromosomas, a pesar de las numerosas placas examinadas. El número de estomas por área (tabla 1), y las características morfológicas de este árbol, tamaño de hojas, flores, frutos, permiten caracterizarlo como un pentaploide ($2n = 55$ cromosomas).

Por otra parte, en tres árboles señalados en la tabla 1 con interrogaciones, el número cromosómico se aproximó al más cercano, debido a limitaciones técnicas del microscopio empleado (mil aumentos, sin cámara lúcida), que impidieron la determinación exacta.

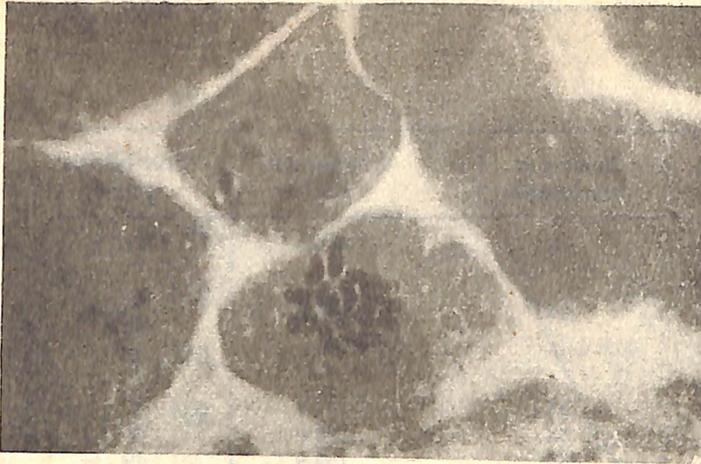


FIGURA 1. Fotografía al microscopio, de cromosomas somáticos en *C. canephora* ($2n=22$). Células de punta de raíz.

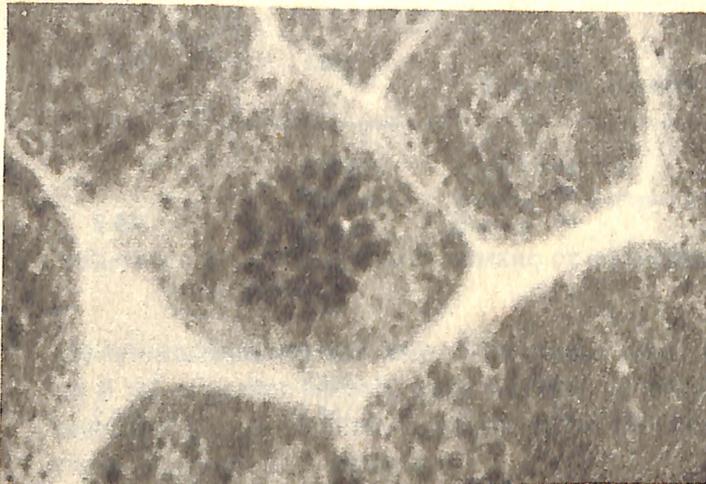


FIGURA 2. Fotografía al microscopio, de cromosomas somáticos de *C. arabica* Var. caturra. ($2n=44$). Células de punta de raíz.

Con base en el recuento de los cromosomas en las puntas de las raíces de las semillas, y en las características morfológicas de las plantas madres, se determinó el número probable de cromosomas para todos los árboles estudiados, el cual se presenta en la tabla 1. En esta tabla aparece también la cantidad de estomas por milímetro cuadrado de hoja. Como puede verse, se encontró una relación inversa entre el número de estomas por unidad de área y el número de cromosomas (tabla 1 y figura 3), con las excepciones que se presentan a continuación.

El híbrido M-33 con los cromosomas duplicados, muestra un número de estomas un poco mayor que el presentado por la especie con menor número cromosómico (*C. canephora*), en tanto que su progenie penta y hexaploide sigue la regla. Algo similar ocurre en el híbrido triploide Caturra x Canephora CV-13 cuyo número estomático resultó muy alto (231.7).

TABLA 1.- NUMERO DE ESTOMAS POR MILIMETRO CUADRADO Y PROBABLE NUMERO DE CROMOSOMAS.

Material	Número de cromosomas	Estomas por mm ²	Promedio de grupo
C. CANEPHORA	22	214.5	214.5
C. ARABICA var. CATURRA	44	156.8	156.8
ARABICA x CANEPHORA			
CV-1	33	187.2	
CV-2	33	198.9	
CV-4	33	184.9	
CV-12	33	185.6	
CV-13	33	231.7	197.7
HIBRIDO DUPLICADO			
M-33	66	248.1	248.1
PROGENIE H. DUPLICADO			
M-829	66 ó 55	133.4	
M-830	55	163.4	
M-834	66	112.3	136.2
RETROCRUZAMIENTOS DE H. TRIPLOIDE A C. ARABICA			
M-1625	44	187.2	
M-1626	44 (?)	205.1	
M-1627	44	168.5	200.2
F₂ DE POLINIZACION LIBRE DEL H. TRIPLOIDE			
M-2470	44 (?)	183.3	
M-2471	44 (?)	151.3	
M-2474	44	191.9	175.5 (1)
RETROCRUZAMIENTOS DEL H. DUPLICADO A C. ARABICA			
109-1432	44	178.6	
109-1434	44	175.5	
109-1447	44	223.1	
109-1453	44	234.8	
109-1455	44	198.1	202.0

(1) Promedio afectado por un valor bajo (151.3).

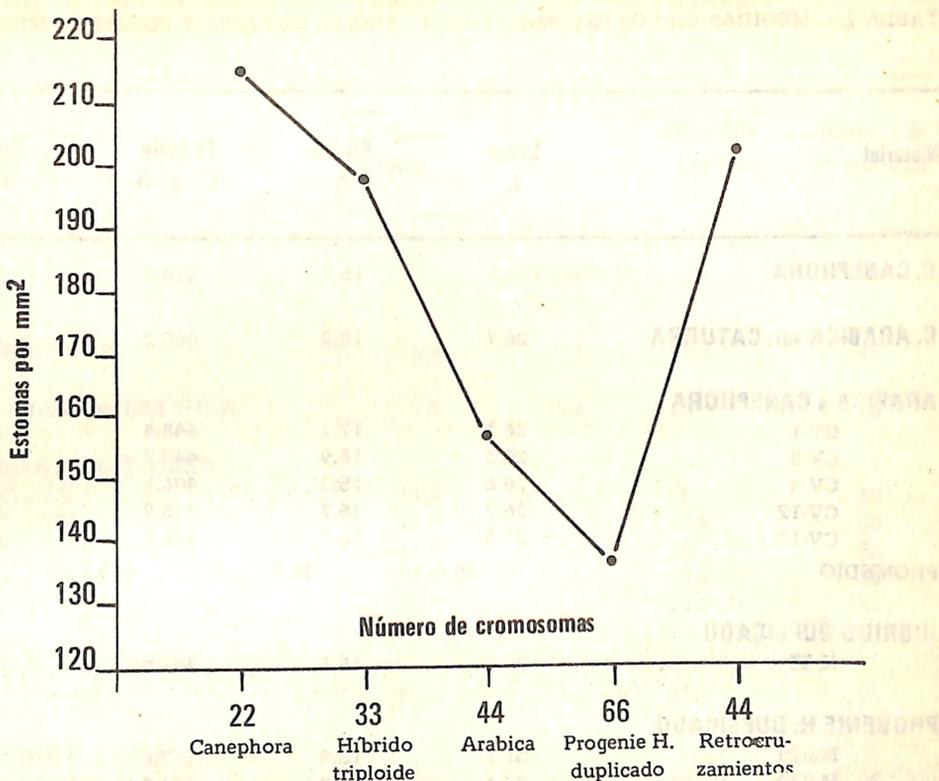


FIGURA 3.- RELACION ENTRE EL NUMERO DE CROMOSOMAS Y EL NUMERO PROMEDIO DE ESTOMAS.

Los retrocruzamientos en la mayoría de los casos tienen un número estomático alto, cercano al del progenitor diploide; quizá provienen de híbridos con alto número de estomas como es el caso de los retrocruzamientos con el híbrido duplicado M-33, o se presente un efecto dominante de *C. canephora*.

Los resultados de las medidas de los estomas se presentan en la tabla 2.

En lo que se refiere a largo y ancho de los estomas, se observó que las variaciones dentro de una muestra, son menores en el largo, quizás debido a que la turgencia de las células guardas afecta más las anchura que la longitud.

Las células guardas del estoma son un poco más largas en la progenie del híbrido con los cromosomas duplicados (tabla 2). Una evaluación más precisa de estas dos medidas, puede hacerse comparando las áreas promedio del rectángulo que circunscribe las células guardas del estoma, esto es, su tamaño ($L \times A$). Este fué mayor en la progenie del híbrido hexaploide. Los retrocruzamientos en general están más cerca de la especie *C. arabica* que de *C. canephora*. De nuevo el M-33 se aparta de lo esperado.

Parece ser que la especie diploide *C. canephora* tiene estomas alargados y de menor tamaño

TABLA 2.- MEDIDAS EN LOS ESTOMAS: LARGO, ANCHO, TAMAÑO, Y FORMA EN MICRAS.

Material	Largo L	Ancho A	Tamaño L x A	Forma A/L
C. CANEPHORA	26.7	15.7	419.7	.59
C. ARABICA var. CATURRA	26.7	18.2	488.2	.69
ARABICA x CANEPHORA				
CV-1	26.1	17.1	448.4	.66
CV-2	26.3	16.9	443.7	.64
CV-4	26.6	15.3	406.1	.58
CV-12	26.7	16.7	446.9	.63
CV-13	27.3	16.7	456.1	.61
PROMEDIO	26.6	16.5	440.2	.62
HIBRIDO DUPLICADO				
M-33	26.9	15.1	401.4	.57
PROGENIE H. DUPLICADO				
M-829	31.1	18.9	587.8	.61
M-830	29.1	19.7	574.5	.68
M-834	31.9	19.9	659.2	.60
PROMEDIO	30.7	19.5	607.2	.63
RETROCRUZAMIENTOS DEL H. TRIPLÓIDE A C. ARABICA				
M-1625	29.6	18.0	532.0	.61
M-1626	27.6	18.4	508.4	.67
M-1627	29.1	19.0	553.7	.65
PROMEDIO	28.8	18.5	531.4	.64
F₂ DE POLINIZACION LIBRE DEL H. TRIPLÓIDE				
M-2470	27.6	17.4	481.0	.63
M-2471	28.3	18.9	534.2	.67
M-2474	29.1	20.3	591.2	.70
PROMEDIO	28.3	18.9	535.7	.67
RETROCRUZAMIENTOS DE H. DUPLICADO A C. ARABICA				
109-1432	27.9	18.7	521.4	.67
109-1434	28.0	19.0	554.3	.68
109-1447	26.3	19.3	507.8	.74
109-1453	26.7	19.9	531.0	.75
109-1455	28.7	19.4	558.6	.68
PROMEDIO	27.5	19.3	534.6	.70

TABLA 3.- NUMERO PROMEDIO DE CLOROPLASTOS EN CELULAS GUARDAS Y EN CELULAS ANEXAS.

Material	No. de Cloroplastos		Número de cromosomas
	En células guardas	En células anexas	
		Promedio de grupos	
C. CANEPHORA	9.8	9.8	22
C. ARABICA var. CATURRA	13.8	13.8	44
ARABICA x CANEPHORA			
CV-1	11.8	D	33
CV-2	10.0	13.6	33
CV-4	11.0	D	33
CV-12	11.8	12.8 (1)	33
CV-13	10.5	14.2 (1)	33
		11.0	
HIBRIDO DUPLICADO			
M-33	12.8	13.5	66
PROGENIE H. DUPLICADO			
M-829	14.7	19.3	66 ó 55
M-830	16.9	19.0	55
M-834	17.6	D	66
		16.4	
RETROCRUZAMIENTOS DEL H. TRIPLOIDE A C. ARABICA			
M-1625	14.4	D	44
M-1626	13.1	D	44 (?)
M-1627	14.9	D	44
		14.1	
F₂ DE POLINIZACION LIBRE DEL H. TRIPLOIDE			
M-2470	15.9	D	44 (?)
M-2471	15.6	D	44 (?)
M-2474	15.5	D	44 (?)
		15.6	
RETROCRUZAMIENTOS DEL H. DUPLICADO A C. ARABICA			
109-1432	16.1	12.8	44
109-1434	16.0	D	44
109-1447	14.2	13.2	44
109-1453	13.7	D	44
109-1455	15.0	D	44
		15.0	

D No coloreados

(1) Contados en una sola célula subsidiaria y multiplicados por dos.

que la especie *C. arabica*. Los híbridos poseen características intermedias y los retrocruzamientos en el presente caso, se acercan en su forma al *C. arabica*.

Con respecto al número de cloroplastos de las células guardas de los estomas, se encontró una relación directa con el número de cromosomas (tabla 3). En estas observaciones, se encontraron también cloroplastos en las células anexas, (figuras 4 y 5), en número constante para cada especie y en relación directa con el número cromosómico (tabla 3). De todos los árboles estudiados, el único que no siguió esta tendencia, fué nuevamente, el M-33.

Se observó que el número de cloroplastos crece cuando crece el número cromosómico y cuando se duplican los cromosomas. Los incrementos no guardaron una proporción definida con el aumento en el número de cromosomas pero la tendencia fué similar tanto para las células guardas como para las anexas. (figura 6).

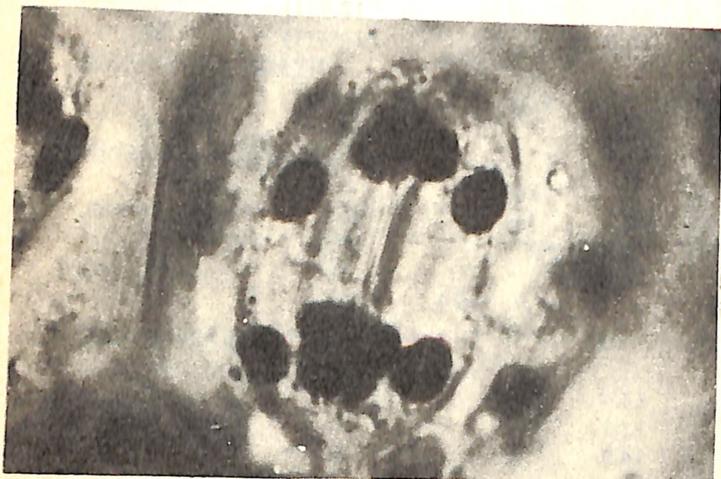


FIGURA 4. Fotografía al microscopio, de cloroplastos en células guardas. Nótese la polarización y el tamaño.



FIGURA 5. Fotografía al microscopio, de cloroplastos en células anexas. Nótese su distribución periférica y su tamaño similar a los de las células guardas.

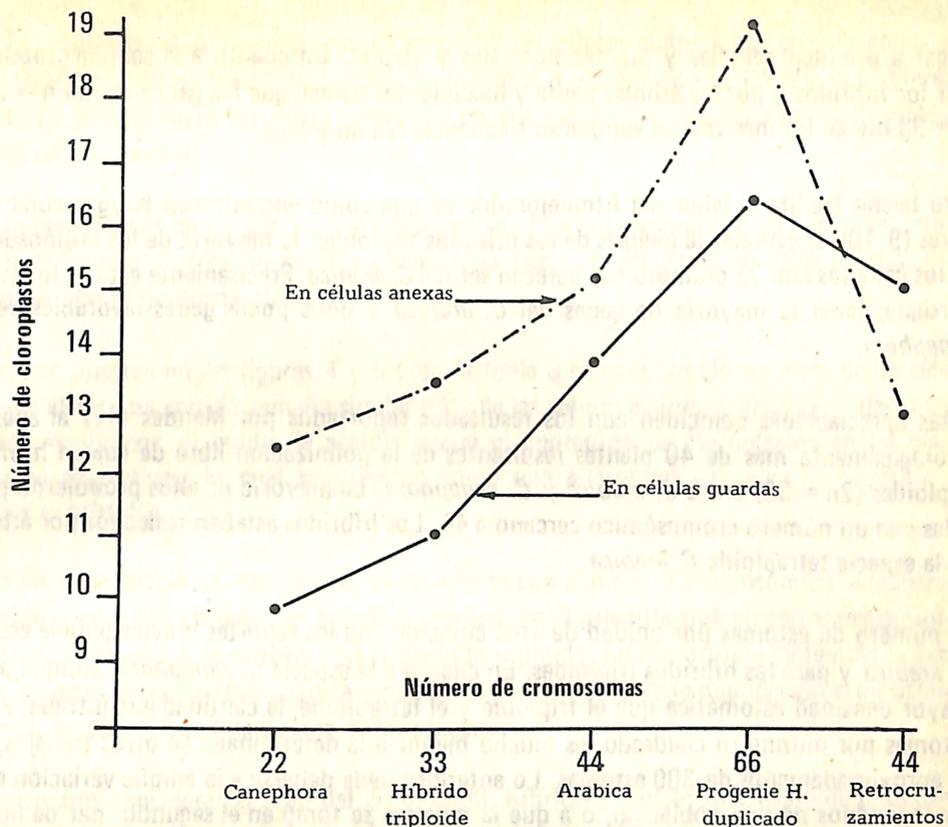


FIGURA 6.- RELACION ENTRE EL NUMERO DE CROMOSOMAS Y EL NUMERO PROMEDIO DE CLOROPLASTOS EN CELULAS GUARDAS Y ANEXAS DEL ESTOMA.

En el presente trabajo sólo se contaron las muestras que tenían cloroplastos coloreados. En aquellas que los poseen pero decolorados (D) (tabla 3), no se definió su número pues es fácil confundirlos con inclusiones aceitosas y de otro tipo.

La disposición de los cloroplastos en los estomas de las hojas de las especies de *Coffea* examinadas, sigue un patrón especial no reportado en otras especies. En las células guardas se localizan en los polos (figura 4), mientras en las células anexas están dispersos y localizados hacia la periferia (figura 5).

DISCUSION

El hecho de que la gran mayoría de las semillas, producidas tanto por los híbridos como por los retrocruzamientos y aún el híbrido duplicado y su progenie, presenten un número de cromosomas somáticos cercano a 44, indica que los granos de polen o los óvulos con $n = 22$ cromosomas son los más importantes funcionalmente; esto es obvio para los retrocruzamientos con la especie *C. arabica*, la cual produce óvulos con 22 cromosomas aceptando preferencialmente granos de polen con igual número de cromosomas, al menos para

llegar a producir semillas y plantas normales y viables. En cuanto a la semilla producida por los híbridos y por los árboles penta y hexaploides parece que los gametos con $n = 22$ y $n = 33$ fuesen los más viables aunque su frecuencia sea muy baja.

Este hecho facilita la labor del fitomejorador ya que como encontraron Krug y colaboradores (9, 10), al estudiar la meiosis de los híbridos triploides, la mayoría de los cromosomas de los gametos con 22 cromosomas parecen ser del *C. arabica*. Precisamente esto es lo que se persigue; tener la mayoría de genes del *C. arabica* y unos pocos genes favorables del *C. canephora*.

Estas apreciaciones coinciden con los resultados reportados por Mendes (12) al analizar citológicamente más de 40 plantas resultantes de la polinización libre de cuatro híbridos triploides ($2n = 33$) entre *C. arabica* y *C. canephora*. La mayoría de ellos produjeron plántulas con un número cromosómico cercano a 44. Los híbridos estaban rodeados por árboles de la especie tetraploide *C. arabica*.

El número de estomas por unidad de área coincide con los reportes previos para la especie *C. arabica* y para los híbridos triploides. En cuanto a la especie *C. canephora*, aunque posee mayor densidad estomática que el triploide y el tetraploide, la cantidad encontrada, 214.5 estomas por milímetro cuadrado, es mucho menor a la determinada en otros trabajos, que es aproximadamente de 300 estomas. Lo anterior puede deberse a la amplia variación entre los individuos de una población, o a que la muestra se tomó en el segundo par de hojas a partir del ápice de la rama; esto parece no afectar los conteos en la especie *C. arabica* y en los híbridos, pero sí en la especie *C. canephora*. Las determinaciones hechas en trabajos anteriores (7, 16, 19) pertenecen al tercer par de hojas.

El tamaño de los estomas, permite diferenciar la progenie penta y hexaploide. Para el café como para otras plantas en las que se ha duplicado el número cromosómico, algunos órganos presentan gigantismo debido generalmente al incremento de tamaño de las células, antes que al aumento en el número de éstas (18). Las células guardas de los estomas en la progenie del híbrido con los cromosomas duplicados aumentaron notablemente de tamaño.

El número de estomas por unidad de área y el número de cloroplastos tanto en las células guardas como en las anexas, están estrechamente relacionados con la especie y con el grado de ploidía. La relación inversa, estomas número de cromosomas, ya había sido descrita y confirmada (7, 16, 17, 19) en tanto que la relación directa, número de cloroplastos número de cromosomas para el café, no se encontró registrada en la literatura consultada (1, 4).

Se puede suponer que si en los progenitores el número de cloroplastos en las células anexas es un carácter bien definido, no se pierda en los híbridos ni en los retrocruzamientos (tabla 3) pudiendo explicarse la no coloración en algunos casos por retardos en el montaje de las muestras, pues como explican Mochizuki y Sueoka (15), en hojas viejas no es exitosa la tinción.

Se ha utilizado el número de cloroplastos en las células guardas del estoma como una característica útil al tratar de identificar híbridos o plantas de una especie con diferente grado de ploidía, pero no existe referencia de que ocurra algo similar con los cloroplastos de las células anexas.

En la generalidad de las plantas cultivadas no se observan cloroplastos en las células anexas y en el género *Coffea* no se había registrado antes su presencia en estas células, ni su relación con el grado de ploidía.

Como se observa en las figuras 4 y 5 y en la tabla 3, en café, los cloroplastos de las células anexas al estoma son de tamaño similar a los de las células guardas y aparecen relacionados directamente con el grado de ploidía y con el contenido de cloroplastos en las células guardas respectivas, lo cual se presenta como una alternativa útil para caracterizar especies e híbridos.

Para las características estomáticas, las relaciones con el número cromosómico, encontradas en café y en otros cultivos, se cumplen también en el presente trabajo en los progenitores, híbridos triploides y la progenie del híbrido hexaploide. En los retrocruzamientos la expresión de estas características parece modificada por el efecto de la duplicación cromosómica o por la acción dominante de una de las especies.

Es necesario considerar el caso del árbol M-33, híbrido originalmente triploide pero posteriormente duplicado en estado de plántula mediante la aplicación de colchicina en la yema apical de crecimiento ortotrópico. Es notorio que para las características número de estomas por unidad de área, tamaño y forma de los estomas, número de cloroplastos en células guardas y anexas, se comporta como una excepción a las relaciones establecidas con el número cromosómico en tanto que su progenie penta y hexaploide sigue un patrón normal. Aún cuando fenotípicamente la mayoría de las ramas del árbol presentan actualmente hojas y frutos con el gigantismo característico de los poliploides, pudieron ocurrir modificaciones con el transcurso del tiempo. Este árbol fue duplicado en 1966 y su progenie se obtuvo en 1967, quizás cuando todavía no había variado mucho.

Como se dijo, la duplicación se hizo en la yema terminal en estado de plántula, por tanto el sistema radical y parte del tronco son triploides. No se sabe si esta condición ocasiona modificaciones con el tiempo. De otra parte, puesto que hay tres capas de células más o menos diferentes en los puntos de crecimiento, pueden resultar tres tipos de poliploides; poliploidía epidérmica o duplicación de la parte más externa, puede afectar los estomas; poliploidía interna, la epidérmis no se afecta; y poliploidía total, en la que todos los tejidos se han duplicado (6). El primer caso podría explicar en parte lo ocurrido en el árbol M-33, aun cuando raras veces se presenta.

Como ya se dijo, en las especies e híbridos de *Coffea* estudiados aquí, es notoria la presencia y constancia en número de cloroplastos, en gran porcentaje de las células anexas. Esta

presencia de cloroplastos en las células anexas en número relativamente alto puede considerarse como un recurso anatómico del cafeto para aprovechar más efectivamente la escasa cantidad de luz que llega al envés de las hojas en árboles sombreados o en ramas autosombradas. La funcionalidad de estos cloroplastos puede deducirse de su tamaño y su poder de tinción (figura 5).

Muchos investigadores han indicado que los movimientos estomáticos son el resultado de cambios diferenciales en la presión de turgor entre las células guardas y otras células epidérmicas. Recientemente se ha atribuido al transporte activo de iones un papel importante en la inducción de los cambios de turgor (5, 20, 21).

Se cree que el flujo de iones puede ser el mecanismo principal que ocasione los cambios de presión osmótica de las células guardas, los que resultan por entrada y salida de agua, en apertura y cierre estomáticos.

El Potasio (K^+) es considerado como el mayor catión envuelto en el mecanismo estomático (20). Así, para un grupo de investigadores sería más importante, para el movimiento de los estomas, la acción directa de la luz como un excitante iónico, que la producción fotosintética de solutos orgánicos por los cloroplastos de las células guardas.

Habría necesidad para el cafeto, de investigar cuál de los dos factores es el más importante, o si en cambio puede existir también en café un mecanismo diferente a los descritos, similar a los sugeridos para las plantas con metabolismo de tipo CAM, (metabolismo del ácido crasuláceo), el cual presenta poca relación con los procesos que requieren la luz (21). Este estudio da bases para pensar que la cantidad y el tamaño de los cloroplastos del estoma indican que en el café estos organoides desempeñan un papel destacado en el movimiento estomático, muy probablemente de tipo fotosintético. Son necesarios estudios fisiológicos y ultramicroscópicos que establezcan la estructura y funciones, tanto de los cloroplastos de las células guardas, como los de las células anexas comparándolas con los de las células del mesófilo.

CONCLUSIONES

Los árboles de café con diferentes niveles de ploidía se pueden separar de acuerdo a características tales como, cantidad de estomas por unidad de área y número de cloroplastos en las células guardas y anexas del estoma. Estos factores sumados a registros morfológicos y bioquímicos permitirán seleccionar los híbridos más cercanos a la especie tetraploide.

Tanto en los híbridos interespecíficos como en los retrocruzamientos, se producen por polinización libre semillas viables en las que predomina un número cromosómico $2n=44$ o los aneuploides más cercanos a él

El número de estomas por área varía en forma inversa respecto al número cromosómico, sin superponerse los promedios para cada grado de ploidía.

En cuanto a los cloroplastos en las células guardas de los estomas, el café presenta un número relativamente constante para cada especie, el cual varía directamente respecto al número de cromosomas.

Se reporta por primera vez en café la presencia en número constante de cloroplastos en las células subsidiarias de los estomas. Posiblemente sean un recurso de las plantas humbrófilas para mejor captación de la luz y su aprovechamiento en el movimiento estomático.

Tanto los cloroplastos de las células guardas como los de las células anexas son grandes, y bien desarrollados.

Al duplicar los cromosomas se aumenta el número de cloroplastos en células guardas y anexas pero no varía su tamaño. En general los híbridos presentan características intermedias respecto a sus progenitores.

RESUMEN

En un híbrido interespecífico entre *Coffea arabica* variedad caturra K.M.C. ($2n = 44$) y *C. canephora* P. ex Fr. ($2n = 22$), se analizaron progenitores, híbridos, triploides, un árbol híbrido duplicado, su progenie y los retrocruzamientos, usando como padre recurrente la variedad caturra del *C. arabica*, en cuanto a: número de cromosomas de las semillas obtenidas por polinización libre; número, tamaño y forma de los estomas; y número de cloroplastos en las células guardas y subsidiarias del estoma.

Los resultados indican para especies e híbridos, relación entre el grado de ploidía y estas características, así: inversa con el número de estomas por unidad de área y directa con el número de cloroplastos en células guardas y anexas del estoma.

Los retrocruzamientos parecen haber sido influenciados más por el *C. canephora*. Al duplicar los cromosomas aumenta el tamaño de los estomas.

Se reporta por primera vez para el café, la presencia de cloroplastos en las células subsidiarias de los estomas. Estos cloroplastos son tan grandes como los de las células guardas, reducen el nitrato de plata, se presentan en número constante para cada especie y aumentan directamente de acuerdo al grado de ploidía.

Se concluye que con base en estudios de este tipo, complementados con trabajos morfológicos y bioquímicos, se pueden seleccionar en forma temprana, materiales promisorios para cruzamientos posteriores.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACCORSI, W. R. Características morfológicas, anatómicas e citológicas da epiderme inferior da folha das rubiaceae. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Anais 6:23-51. 1949.
- 2.- CENTRO DE INVESTIGACAO DAS FERRUGENS DO CAFEIRO, OEIRAS, PORTUGAL, Progress report 1960-1965. Oeiras, 1965. 144 p.
- 3.- DABROWSKA, J. Correlation between the number of chloroplasts in stomatal guard cells and the degree of polyploidy of 14 taxa of *Achillea* L. Herba Pol. 17(3): 200-208. 1971. (Original no consultado; compendiado en Biological Abstracts. 54(11): 5888. 1972).
- 4.- DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento antogenético de *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer. Bragantia 16(23): 315-366. 1957.
- 5.- DOWNTON, W. J. S. and TREGUNNA, E. B. Carbon dioxide compensation its relation to photosynthetic carboxylation reactions, systematics of the gramineae, and leaf anatomy. Canadian Journal of Botany 46(3): 207-215. 1968.
- 6.- ELLIOTT, C. F. Citogenética y mejoramiento de plantas. México, D. F., Continental, 1964. pp. 179-204.
- 7.- FRANCO, C. M. Relation between chromosome number and stomata in *Coffea*. Botanical Gazette 100(4): 817-827. 1939.
- 8.- HOWARD, H. W. Genetics of the potato *Solanum tuberosum*. London, Logos, 1970. p. 61.
- 9.- KRUG, C. A. and CARVALHO, A. The genetics of *Coffea*. Advances in Genetics 4:127-158. 1951.
- 10.- ——— e MENDES, A. J. T. Observacoes citológicas em *Coffea*. IV. Bragantia 1(5): 467-482. 1941.
- 11.- MENDES, A. J. T. Observacoes citológicas en *Coffea*. XV. Microsporogenese em *Coffea arabica* L. Bragantia 10(3): 79-87. 1950.
- 12.- ——— A hibridacao interespecifica no melhoramento do cafeeiro. Bragantia 11(10-12): 297-306. 1951.
- 13.- MENDES, C. H. T. Acao do paradioclorobenzeno sobre os cromossomios somáticos. Bragantia 10(12): 365-369. 1950.
- 14.- ——— Observacoes citológicas em *Coffea*. XVI. Microsporogenese em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia 10(4): 97-104. 1950.
- 15.- MOCHIZUKI, A. and SUEOKA, N. Genetic studies on the number of plastid in stomata. I. Effects of autopolyploidy in sugar beets. Cytologia 20: 358-366. 1955.
- 16.- RAO, Y. R. A. and VISHVESHWARA, S. Studies in polyploids of *Coffea*. I. Polyploidy and stomata. Indian Coffee 24(7): 303-306. 1960.
- 17.- SILVA, M. L. F. J. Melhoramento genético do cafeeiro, duplicacao cromosômica de cafeeiros diploides. Nova Lisboa, Instituto de Investigacao Agronómica de Angola. Serie Científica No. 28. 1973. pp. 1-9.

- 18.- STEBBINS, G. L. Occurrence and nature of polyploid types. In ----- Variation and evolution in plants. New York, Columbia University, 1951. pp. 298-341.
- 19.- WILLIAMS, J. A. A method for differentiating between *Coffea arabica* and *C. canephora* plants and their hybrids. Turrialba (Costa Rica) 22(3): 263-267. 1972.
- 20.- WILLMER, C. M. and PALLAS JUNIOR, J. E. A survey of stomatal movements and associated potassium fluxes in the plant kingdom. Canadian Journal of Botany 51(1): 37-42. 1973.
- 21.- ZELITCH, I. Stomatal control. Annual Review of Plant Physiology 20: 329-350. 1969.

APENDICE 1.- MATERIAL BASICO UTILIZADO Y SU GENEALOGIA.

Progenitores	Fecha de siembra
C. ARABICA var. CATURRA árbol CV-1 árbol CV-3	Nov. 1954
C. CANEPHORA árbol CV-1 árbol CV-5	Dic. 1964
HIBRIDOS F₁	
C. ARABICA x C. CANEPHORA CV-1 x CV-5 = CV-1 CV-3 x CV-5 = CV-2 CV-1 x CV-5 = CV-4 CV-3 x CV-5 = CV-12 CV-3 x CV-5 = CV-13	Dic. 1966
HIBRIDO F₁ CON DUPLICACION DE CROMOSOMAS	
C. ARABICA x C. CANEPHORA árbol M-33	Dic. 1966
PROGENIE F₁ DEL ARBOL DUPLICADO M-33 árbol M-829 árbol M-830 árbol M-834	Dic. 1967
RETROCRUZAMIENTOS A LA var. CATURRA DEL HIBRIDO F₁	
C. ARABICA var. CATURRA 424-L-38 (C. ARABICA var. CATURRA x C. CANEPHORA CV-1) árbol M-1625 árbol M-1626 árbol M-1627	Oct. 1969
F₂ DEL HIBRIDO C. ARABICA x C. CANEPHORA (de polinización libre) árbol M-2470 árbol M-2471 árbol M-2474	Sep. 1969
RETROCRUZAMIENTOS A LA var. CATURRA DEL HIBRIDO CON DUPLICACION.	
C. ARABICA var. CATURRA CV-1 (C. ARABICA var. CATURRA x C. CANEPHORA M-33) árbol 109-1432 árbol 109-1434 árbol 109-1447 árbol 109-1453 árbol 109-1455	Sep. 1969