

EFECTO DEL NIVEL DE INTROGRESIÓN Y DEL AMBIENTE SOBRE LA POLINIZACIÓN EN CRUZAMIENTOS CONTROLADOS DE CAFÉ

Juan Carlos Herrera Pinilla.*; Laura Fernanda Gonzales**

HERRERA P., J.C.;GONZALES, L.F. Efecto del nivel de introgresión y del ambiente sobre la polinización en cruzamientos controlados de café. *Cenicafé* 64 (2): 17-30. 2013

El efecto del nivel de introgresión de los progenitores masculinos durante la polinización manual del café fue evaluado en la Estación Central Naranjal de Cenicafé. Para ello se estimó la frecuencia de cuajamiento y la eficiencia de polinización de 101 cruzamientos, intra e interespecíficos, utilizando las especies *Coffea arabica* y *C. liberica*. A manera de comparación se evaluaron las mismas variables en autofecundaciones controladas sobre *C. arabica*. Se observó que la frecuencia de cuajamiento de cruzamientos en que intervienen las líneas S.288, S.795 y BA-2 (consideradas como poco introgresadas por la especie diploide *C. liberica*), fue similar a la observada para los cruces interespecíficos con el híbrido Kawisari (híbrido tetraploide natural entre *C. liberica* y *C arabica*). Sin embargo, la eficiencia de cruzamiento fue significativamente superior ($p<0,05$) para los cruces intraspecíficos, observándose incluso diferencias entre S.288 y los genotipos S.795 y BA-2, las cuales se explican por su origen genético. La eficiencia de cruzamiento mostró ser una variable directamente dependiente de la frecuencia de cuajamiento ($R^2 = 0,912$), sin embargo esta relación no se mantuvo igual para el caso de los cruzamientos interespecíficos involucrando el híbrido Kawisari y *C. liberica*, debido a la reducción significativa de frutos jóvenes que ocurre a causa de la incompatibilidad genética entre progenitores. Una comparación entre cruzamientos realizados en dos épocas distintas en el año 2011, mostró que la eficiencia de los cruzamientos también puede verse disminuida por las precipitaciones previas a la polinización controlada.

Palabras clave: Polinización cruzada, compatibilidad genética, *Coffea liberica*, hibridación.

EFFECT OF INTROGRESION LEVELS AND THE ENVIRONMENT ON THE POLLINATION IN COFFEE CONTROLLED CROSSINGS

The effect of introgression level of male parents during hand pollination of coffee was evaluated in the Experimental Station Naranjal of Cenicafé by estimating the frequency of young fruits and pollination efficiency of 101 crosses involving *Coffea arabica* and *C. Liberica* species. The same variables were compared in controlled self pollinations in *C. arabica*. The frequency of young fruit of crosses, in which lines S.288, S.795 and BA-2 (considered lowly introgressed by the diploid species *C. liberica*) were concerned, was similar to that observed in the interspecific crosses with the Kawisari hybrid (a natural tetraploid hybrid between *C. liberica* and *C arabica*). However, the crossing efficiency was significantly higher ($p<0,05$) for intraspecific crosses, even with differences between S.288 and genotypes S.795 and BA-2, which is explained by their genetic origin. Mating efficiency showed to be a variable directly dependent on the frequency of young fruit ($R^2 = 0.912$), but this relation was not equal for the interspecific crosses involving the Kawisari hybrid and *C. liberica* due to the significant reduction of young fruits that occurs because of the genetic incompatibility between parents. A comparison of crosses made in two different periods in 2011 showed that the efficiency of crosses can also be diminished by precipitations prior to controlled pollination.

Keywords: Cross pollination, gene introgression, genetic compatibility, *Coffea liberica*, plant hybridization.

* Biólogo, MSc, PhD. Investigador Científico III, Disciplina Mejoramiento Genético, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

** Bióloga, Investigadora asociada, Disciplina de Mejoramiento Genético (Hasta el 1 febrero de 2011), Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La polinización es el proceso mediante el cual los gametos masculinos (polen) de una planta se ponen en contacto con la estructura receptiva (estigma) del órgano femenino de la flor. Una vez el polen se adhiere al estigma se activa el desarrollo del tubo polínico, el cual se dirige al ovario a través del estilo. Este proceso finaliza con la formación del cigoto, gracias a la fusión del contenido genético del polen con el núcleo de la ovocélula (fecundación). Es a partir del cigoto que se desarrollará el nuevo fruto. En condiciones naturales, la polinización permite la supervivencia de un elevado número de especies cultivadas por el hombre, las cuales comparten este tipo de reproducción, ya que asegura la transferencia del material genético de una generación a la siguiente, a la vez que contribuye a incrementar su productividad (13).

Según la procedencia del polen es posible distinguir dos tipos de polinización. Cuando éste proviene de las anteras de la misma flor que será fecundada se denomina autopolinización. Cuando el polen proviene de una flor diferente, generalmente de otra planta de la misma especie, se dice que la polinización es cruzada. En el café se encuentran estos dos mecanismos de polinización natural. En la especie *C. arabica* ocurre preferencialmente la autopolinización (>90%), mientras que en las demás especies, incluida la especie diploide cultivada *C. canephora*, se presenta la polinización cruzada, debido a la presencia de alelos de autoincompatibilidad (2).

El mejorador de plantas se vale de la hibridación para combinar las mejores características de dos progenitores, en una nueva planta denominada "híbrido", el cual se obtiene mediante polinización controlada o manual. Dadas las ventajas que ofrece, esta práctica constituye la herramienta principal del mejoramiento de cultivos para crear

variabilidad genética y explotarla posteriormente por medio de selección, haciendo posible la conjugación de múltiples factores genéticos de importancia agronómica en las nuevas variedades.

La producción controlada de híbridos dentro de la especie *C. arabica* y entre ésta y las demás especies del género, ha sido una práctica común desde los inicios del mejoramiento del café, hace ya más de 80 años. Cuando el cruzamiento se hace entre plantas de una misma especie se le denomina intraespecífico, mientras que si involucra plantas de diferentes especies (por ejemplo, *C. arabica* y *C. canephora*), se habla de un cruzamiento interespecífico. En todos los casos el objetivo es el mismo: conjugar caracteres de interés agronómico en el híbrido obtenido.

Durante la producción de híbridos intra o interespecíficos lo que se busca es obtener un máximo de recombinación genética, acompañado de una buena fertilidad. No obstante, en la práctica resulta difícil encontrar un equilibrio entre estos dos factores.

La introgresión es el proceso mediante el cual una porción del material genético de una especie es transferida hacia el genoma de otra especie relacionada (genotipo introgresado), gracias a la hibridación. El éxito de la introgresión depende de las posibilidades de hibridación entre dos especies o genotipos, las cuales guardan relación con el grado de proximidad genética que posean (9). Genotipos muy diferentes genéticamente tienen pocas posibilidades de introgresión, debido a la aparición de barreras reproductivas, que pueden ser pre-cigóticas, cuando impiden la formación del cigoto, y/o post-cigóticas, cuando limitan el desarrollo del cigoto ya formado. Estas barreras son esencialmente el resultado de la incompatibilidad genética

entre los cromosomas de las dos especies hibridizadas y sus consecuencias se verán reflejadas en la fertilidad de los híbridos, los cuales van a sufrir una recombinación deficiente durante la meiosis (9, 26).

A pesar de su importancia, son pocos los estudios realizados en café sobre los factores limitantes de la polinización manual. Aspectos tales como: el método de emasculación (14), el embolsado de las ramas y el almacenamiento del polen (22, 25), así como la disposición de las plantas receptoras y donadoras en el campo (8, 18) han sido objeto de estudios más o menos detallados. En Colombia, Jiménez y Castillo (10) realizaron observaciones relacionadas con la eficiencia de la polinización artificial respecto a la polinización natural, en aspectos como la frecuencia de formación de frutos, el momento adecuado para hacer la emasculación según el color de las flores y la forma de recolección del polen.

Según Carvalho (5), el éxito de la obtención de frutos por polinización artificial en café depende de varios factores: (i) las condiciones vegetativas de la planta madre, (ii) la compatibilidad de los genotipos cruzados, (iii) la constitución citológica y genética de las plantas cruzadas, y (iv) las condiciones ambientales durante el desarrollo del fruto. Dentro de éstos, el análisis de los factores genéticos y particularmente de la introgresión, merecen especial atención como factores limitantes del proceso de polinización artificial. Conocer su efecto puede ser de gran importancia para predecir la obtención de genotipos híbridos y de paso planificar de una mejor manera los cronogramas de cruzamiento. En este orden de ideas, el objetivo del presente estudio fue examinar el efecto del nivel de introgresión de los progenitores masculinos (donantes de polen) sobre la eficiencia de los cruzamientos realizados por polinización manual, tal como

se realiza actualmente en Cenicafé, utilizando para ello un conjunto de datos tomados a partir de diversos cruzamientos tanto intra como interespecíficos realizados por la Disciplina de Mejoramiento Genético. Paralelamente, se comparó la eficiencia de cruzamientos realizados en dos momentos diferentes del año, a fin de analizar el posible efecto de los factores climáticos imperantes durante la polinización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y tipo de cruzamientos analizados

Con el fin de entender la relación entre el nivel de introgresión y la eficiencia del proceso de polinización artificial, se compararon los datos de campo derivados de diferentes cruzamientos realizados en la Estación Central Naranjal de Cenicafé, durante el año 2011.

En la Tabla 1 se describe la genealogía de los genotipos utilizados en todos los cruzamientos. En esencia, se realizaron dos tipos de cruzamientos: intra- e interespecíficos. En todos los casos la planta receptora del polen (progenitor femenino) estuvo representada por una línea avanzada derivada del cruzamiento entre Caturra x Híbrido de Timor, a las cuales se les denominará en adelante como Catimores.

Los tres primeros cruzamientos analizados fueron catalogados como intra-específicos teniendo en cuenta que los genotipos usados como progenitores masculinos (donantes del polen) presentaban un grado de introgresión muy bajo, con un fondo genético esencialmente derivado de la especie *C. arabica*. Estos genotipos correspondieron a líneas S.288, S.795 y BA-2, las cuales son derivadas de selecciones avanzadas en el programa de mejoramiento de la India (16, 17).

Tabla 1. Descripción del tipo y número de cruzamientos estudiados.

Cruzamiento	Tipo ^{2/}	Número de cruzamientos analizados	Total de flores polinizadas
Variedades <i>C. arabica</i> autofecundadas	Control	5	2.152
Línea de (Cat x HdT)1/ x S288/23	Intraespecífico	18	2.265
Línea de (Cat x HdT) x S795	Intraespecífico	21	2.264
Línea de (Cat x HdT) x BA-2	Intraespecífico	31	4.338
Línea de (Cat x HdT) x Kawisari	Interespecífico	24	2.999
Línea de (Cat x HdT) x <i>C. liberica</i>	Interespecífico	7	1.120
	Total	106	15.138

^{1/} Las plantas receptoras de polen (progenitores femeninos) fueron líneas F4-F5 derivadas de diferentes experimentos (MEG271, MEG527, MEG1316 y MEG1337), producto de cruzamientos entre Caturra x Híbrido de Timor.

^{2/} El tipo de cruzamiento se determinó de acuerdo al genotipo de los respectivos progenitores masculinos.

Los cruzamientos inter-específicos fueron catalogados como tales ya que las plantas donantes del polen estaban representadas por genotipos con un fondo genético esencialmente distinto al de *C. arabica*. El híbrido natural tetraploide ($2n=4x=44$) Kawisari, proviene del cruce entre *C. liberica* x *C. arabica*, razón por la cual es posible suponer que al menos un 33% de su genoma está introgresado por la especie diploide. Por su parte, la especie *C. liberica* ($2n=2x=22$) representa, para este caso, el máximo nivel de introgresión (100%).

En total se estudiaron 106 eventos de polinización manual. Para cada cruce se marcaron entre cuatro y diez ramas por árbol; en cada rama se seleccionó un mínimo de 15 flores para su polinización. Como resultado, se polinizaron 15.138 flores, usando la metodología establecida por Cenicafé para tal fin. A manera de comparación se tuvieron en cuenta los datos previos de autopolinizaciones manuales realizadas en la Disciplina de Mejoramiento Genético. Estas autopolinizaciones fueron realizadas sobre 2.152 flores de las variedades de *C. arabica* como Caturra, Borbón, San Bernardo, Villa Sarchí y Pacas.

Método de polinización manual

La metodología utilizada para la polinización manual en Cenicafé se basa en la propuesta inicialmente por Carvalho y Mónaco (6). Aunque se han realizado diferentes modificaciones, el protocolo actual no dista mucho del original. Las principales etapas del proceso se describen en la Figura 1. Se inició con la selección de las plantas progenitoras, tanto las masculinas que donaron el polen, como las femeninas que portaron las flores fecundadas por éste. Luego, se seleccionaron algunas ramas del progenitor femenino con botones florales en estado de pre-antesis, se retiraron las estructuras florales masculinas (estambres), proceso denominado emasculación (Figura 1A, 1B). Paralelamente, se recolectó el polen de las flores abiertas presentes en el progenitor masculino (Figura 1C). Posteriormente, se esparció el polen sobre los estigmas de las flores emasculadas previamente (Figura 1D). Una vez polinizadas, las flores tratadas se protegieron con bolsas de papel con el fin de prevenir contaminación con polen externo (Figura 1E). Días después se destaparon y se hizo el seguimiento del desarrollo de las flores que fueron polinizadas hasta que se obtuvieron los

frutos híbridos de primera generación o F1. Tanto los cruces interespecíficos como las autofecundaciones fueron realizados siguiendo esta metodología.

Evaluación de la eficiencia de la polinización

Desde un punto de vista biológico, la eficiencia de la polinización se define como la probabilidad que tiene el polen que llega al estigma de una flor (generalmente depositado por un polinizador), de desarrollarse en fruto. Teniendo en cuenta esto y con el fin de poder evaluar la eficacia de la polinización manual en los diferentes cruzamientos, se consideraron las siguientes variables:

$$1. \text{ Frecuencia de cuajamiento (\%)} = (\text{OVF} / \text{FLP}) \times 100$$

$$2. \text{ Eficiencia de cruzamiento (\%)} = (\text{FRF} / \text{FLP}) \times 100$$

Donde:

OVF, representa el número de flores con ovarios fertilizados, encontrados un mes después de la polinización. Este estado coincide con la Etapa 1 del crecimiento del fruto del café descrita por Salazar *et al.* (21), la cual se prolonga hasta la octava semana. Durante ésta ocurre un crecimiento lento y los frutos tienen apariencia de cabezas de fósforo; aún no hay formación de endospermo, aunque su consistencia es acuosa.

FLP, corresponde al número total de flores polinizadas en cada cruzamiento.



Figura 1. Principales etapas del método de polinización manual de flores de café, utilizado por la Disciplina de Mejoramiento Genético de Cenicafé. **a.** Selección de ramas con flores cerradas en la planta madre (progenitor femenino); **b.** Retiro de los estambres de las flores de la planta madre (emasculación); **c.** Recolección de flores del progenitor masculino, donante del polen; **d.** Polinización manual de flores del progenitor femenino con polen proveniente del progenitor masculino; **e.** Embolsado de las ramas con flores polinizadas, a fin de prevenir contaminación con polen exterior.

FRF, es el número total de frutos formados sobre las ramas luego de 16 semanas después de la polinización. Esta etapa coincide con la Etapa 2 del crecimiento del fruto del café descrita por Salazar *et al.* (21), que inicia en la semana 8 y se prolonga hasta la semana 26. En esta etapa se da inicio al crecimiento rápido del fruto, el cual se caracteriza por un aumento exponencial en su peso fresco.

Efecto de las condiciones ambientales

Con el fin de determinar el efecto de algunos factores ambientales sobre los cruzamientos, se comparó la eficiencia de cuatro cruzamientos independientes los cuales se realizaron en enero 2011, y posteriormente se repitieron en febrero del mismo año. Se registraron los valores promedio de temperatura, brillo solar, humedad relativa y precipitación antes, durante y después de la polinización. En cada época de polinización se seleccionaron entre ocho y diez ramas por cruzamiento y se polinizaron en total 1.640 flores (más de 200 flores por cruzamiento).

Análisis de los datos

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico XLSTAT (versión 6,03 de 2009). Se realizó un ANAVA de una sola vía con el fin de establecer diferencias entre cruzamientos según prueba de Fisher al 99%. Las diferencias entre los promedios de cada tratamiento (cruzamiento), se evaluaron mediante la prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 95%. Paralelamente, todos los cruzamientos fueron comparados contra el tratamiento testigo (autofecundaciones) mediante una prueba de Dunnett al 95%.

La relación entre las variables: frecuencia de cuajamiento y eficiencia de cruzamiento, fue analizada mediante una prueba de regresión, en la cual se consideró la eficiencia del

cruzamiento como la variable dependiente (Y) y el porcentaje de cuajamiento como la variable independiente (X).

La comparación entre cruzamientos realizados en dos épocas diferentes fue evaluada según prueba de *t* al 95%, considerando la desigualdad existente entre las varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La polinización, sea natural o artificial, es afectada por diferentes parámetros, cuya importancia varía según el cultivo y el mecanismo de polinización usado. Entre los factores que intervienen en el éxito de los cruzamientos están: la cantidad de polen depositado en el estigma, su viabilidad, su compatibilidad, el número de óvulos disponibles, la tasa de aborto de los óvulos o la tasa de conversión en fruto, entre otros (20, 26). Todos estos factores hacen que la estimación de la eficiencia de la polinización sea una tarea compleja, sin embargo, para el mejorador de plantas esta información resulta importante para planificar el número de cruzamientos a realizar, con el fin de obtener suficiente semilla para formar las nuevas poblaciones de selección. En este trabajo se utilizó la información del número de flores polinizadas y de frutos formados con el fin de establecer el efecto del nivel de introgresión de los genotipos parentales, así como las condiciones climáticas imperantes, sobre la eficiencia de la polinización manual realizada en Cenicafé.

Efecto del nivel de introgresión sobre la eficiencia de la polinización

El éxito en la obtención de frutos depende en buena medida de la afinidad genética entre los dos padres involucrados en el cruzamiento. En el caso del café, es sabido que bajo condiciones naturales todos los

híbridos interespecíficos con *C. arabica* presentan una esterilidad gamética y/o cigótica, variable según la especie diploide utilizada en el cruzamiento (15).

En el presente estudio se puso en evidencia el efecto directo de la introgresión tanto sobre la frecuencia de cuajamiento de las flores como sobre la eficiencia del cruzamiento (Tabla 2). Para la primera variable, se encontraron diferencias significativas entre los cruzamientos analizados, con frecuencias de cuajamiento que oscilaron entre 29,8% y 39,6% para los cruces intraespecíficos entre las líneas de Catimores y los genotipos medianamente introgresados por *C. liberica*, S.288, S.795 y BA-2 (Figura 2). El cruzamiento interespecífico con el híbrido Kawisari mostró un nivel menor de cuajamiento (22,9%), en tanto que, los cruces con la especie *C. liberica* presentaron valores inesperadamente mayores (63,4%). En todos los casos la frecuencia de cuajamiento fue inferior ($p < 0,05$) a la observada para los tratamientos de autofecundación, que presentaron un promedio de 80,8%.

Al analizar la eficiencia del cruzamiento, se observa una tendencia similar en la que los cruces intra-específicos muestran eficiencias entre el 29% y 38%, mientras que los inter-específicos exhiben valores inferiores que van de 12,9% a 16,6% (Figura 3). Es importante resaltar que a pesar de que los híbridos interespecíficos con *C. liberica* tuvieron elevadas frecuencias de cuajamiento, éstas no se tradujeron en un número igualmente elevado de frutos formados, como lo muestran los valores bajos

de eficiencia de cruzamiento obtenidos. La eficiencia media de las autofecundaciones controladas fue de 61,9%, inferior a la observada por Jiménez y Castillo (10), para autopolinizaciones controladas realizadas en Chinchiná, sobre plantas de la variedad Borbón (80,9%).

Estudios de introgresión usando la especie *C. canephora*, muestran que existe una barrera postcigótica muy importante que lleva a una caída significativa del número de frutos normales cuando *C. arabica* es polinizada con polen derivado de híbridos interespecíficos triploides (11). Al parecer, esta reducción sucede por la elevada frecuencia de polen desbalanceado cromosómicamente (es decir, aneuploide) que fertiliza las flores de *C. arabica*. En el caso de los híbridos triploides con *C. liberica*, si bien parece formarse un número importante de cigotos luego de la fecundación, éstos pronto empiezan a degenerar como resultado del desbalance genético entre los gametos (x vs $2x$), dando como resultado un fuerte descenso en el número final de frutos y, por ende, en la eficiencia del cruzamiento.

Mientras en los cruces intraespecíficos se observó una clara dependencia ($p < 0,01$) entre la eficiencia del cruzamiento y la frecuencia de cuajamiento (Figura 4), en los cruces interespecíficos dicha relación deja de ser significativa (Figura 5). En estos últimos, una elevada frecuencia de cuajamiento a las 4 semanas del cruzamiento, no garantiza el desarrollo completo de todos los frutos. La reducción significativa en el número de frutos

Tabla 2. Análisis de varianza para la frecuencia de cuajamiento y la eficiencia de cruzamiento, evaluadas en los diferentes cruzamientos tanto intra- como inter-específicos.

Variable	Fuente de variación	g.l.	SC	CM	F	Probabilidad
Frecuencia de cuajamiento (%)	Cruzamiento	5	20433,48	4086,69	12,97	<0,0001 **
Eficiencia del cruzamiento (%)	Cruzamiento	5	16642,91	3328,58	21,09	<0,0001 **

** Valores significativos a un nivel de confianza del 99 % según prueba de F.

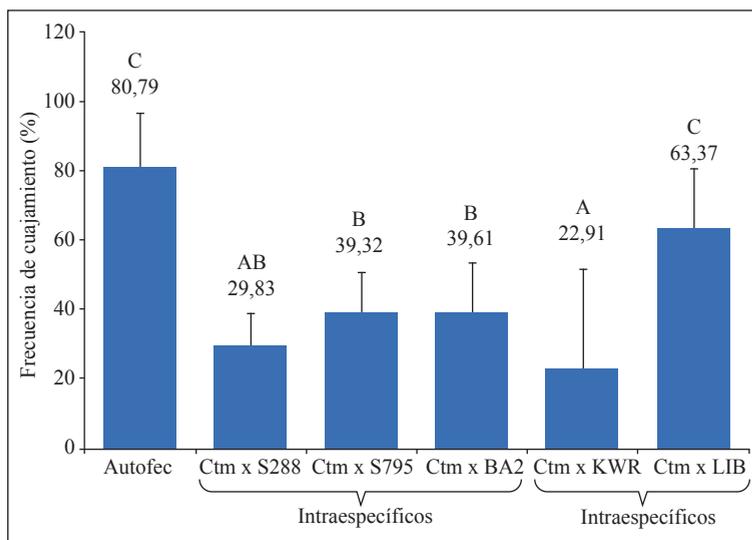


Figura 2. Frecuencia de cuajamiento de los cruzamientos intra- e inter-específicos. La barra indica la desviación estándar estimada. Sobre cada barra se muestran los valores promedio respectivos. Los promedios acompañados de la misma letra, no son estadísticamente diferentes dentro de un intervalo de confianza del 95% según la prueba de Tukey.

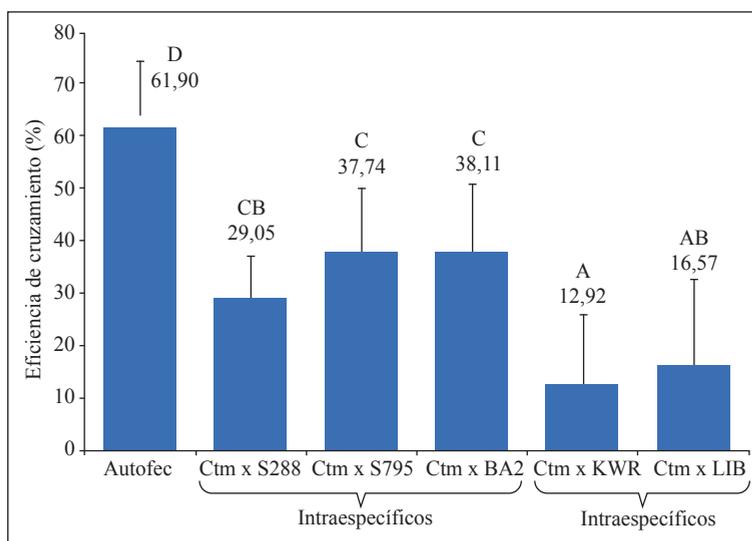


Figura 3. Eficiencia de cruzamiento de los cruzamientos intra- e inter-específicos. La barra indica la desviación estándar estimada. Sobre cada barra se muestran los valores promedio respectivos. Los promedios acompañados de la misma letra, no son estadísticamente diferentes dentro de un intervalo de confianza del 95% según la prueba de Tukey.

jóvenes, es un hecho frecuentemente observado en cruces entre *C. arabica* y las especies diploides. Cuando *C. arabica* ($2n=4x=44$) se cruza con una especie diploide como *C. liberica* ($2n=2x=22$), se observan problemas en la formación de los frutos híbridos, debido en buena medida a la disparidad que existe en su número cromosómico y a las diferencias genéticas entre estas dos especies, las cuales

se manifiestan en baja fertilidad y disturbios a nivel de la meiosis de los pocos híbridos formados (11, 23). El desequilibrio genético que ocurre en la semilla híbrida se traduce en el desarrollo anormal del embrión, o del tejido cotiledonal que le servirá de alimento durante su desarrollo. Según Sybenga (23), la causa última del aborto temprano de la semilla es una reducción en el número cromosómico del

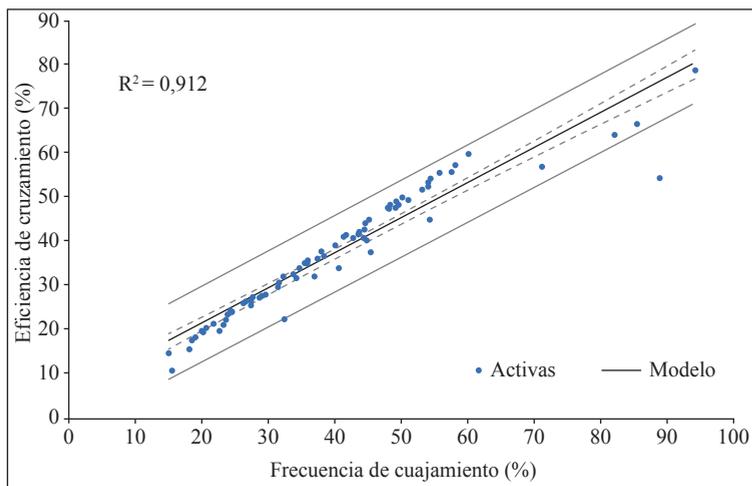


Figura 4. Análisis de regresión entre la eficiencia de cruzamiento y la frecuencia de cuajamiento de los cruces intra-específicos estudiados.

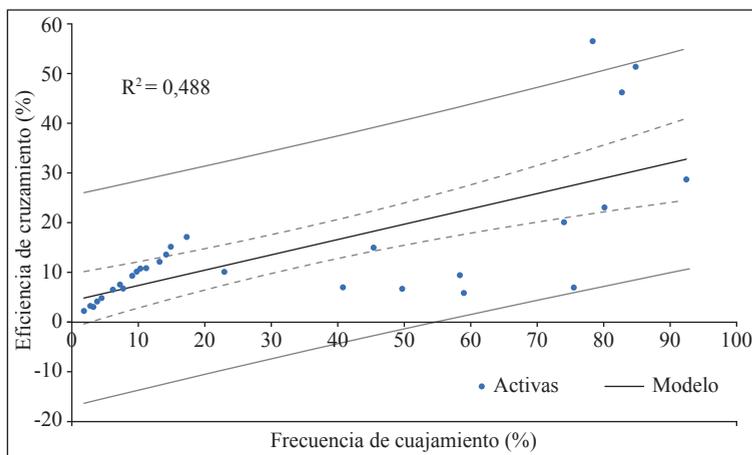


Figura 5. Análisis de regresión entre la eficiencia de cruzamiento y la frecuencia de cuajamiento de los cruces inter-específicos estudiados.

tejido del endospermo, que afecta directamente su viabilidad. Estudios realizados sobre un gran número de híbridos interespecíficos de café sugieren que el desarrollo normal del endospermo, e indirectamente del embrión híbrido, estaría condicionado por una dosis mínima de genoma parental (materno y/o paterno), en los diferentes tejidos que componen la semilla (15).

A pesar de estos problemas, los híbridos triploides entre *C. arabica* x *C. liberica* son capaces de formar algunas semillas. Esto se

explica por la presencia de compatibilidad genética no despreciable entre los genomas de las dos especies, tal como lo muestran los niveles importantes de apareamiento cromosómico observado al estudiar la meiosis de diferentes híbridos triploides (3, 23). Esto ha sido confirmado recientemente usando técnicas citogenéticas de hibridación cromosómica (12).

Entre los cruces intraespecíficos se observó coherencia entre las variables evaluadas y el nivel de introgresión de los

progenitores masculinos (Figuras 2 y 3). Así, para los cruces con S.288 se observaron porcentajes de cuajamiento y eficiencias de cruzamiento significativamente menores ($p < 0,05$), con respecto a los obtenidos con los genotipos S.795 y BA-2, considerados menos introgresados que éste. La variedad S.288 es derivada de autofecundaciones y selecciones de la línea S.26, procedente a su vez de un híbrido natural entre *C. arabica* x *C. liberica* (16). Estimaciones realizadas con base en estudios moleculares de la introgresión del S.288 (19), muestran que este genotipo ha introgresado al menos medio cromosoma de la especie *C. liberica*, el cual estaría representado en fragmentos presentes en dos o tres de sus cromosomas. En otras palabras, al menos 4,5% de su genoma estaría introgresado por *C. liberica*. Por su parte, tanto BA-2 como S.795, corresponden a líneas que fueron seleccionadas a partir de poblaciones derivadas de retrocruzamientos entre S.288 con la variedad Kent de *C. arabica* (16, 17). Por lo anterior, es razonable pensar que sus niveles de introgresión son menores al de la selección S.288 de la cual se derivan.

En general, la eficiencia de la polinización manual observada en este trabajo para *C. arabica* es superior a la observada previamente para la especie *C. canephora* (61,9% vs 25% a 40%), usando una metodología similar. Al igual que en *C. arabica*, en *C. canephora* el éxito de las polinizaciones está determinado, entre otras causas, por la época del año y las diferencias genéticas entre los clones usados como progenitores (4).

Efecto de los factores climáticos sobre la polinización manual

En este estudio se comparó la eficiencia de la polinización manual en dos periodos diferentes. Para ello, se analizaron cuatro cruzamientos interespecíficos que involucraron al híbrido Kawisari y a la especie *C. liberica* (Tabla 3). El análisis estadístico mostró que la frecuencia de cuajamiento entre un mes y otro varió de manera significativa ($p < 0,05$) en dos de los cuatro cruzamientos analizados. Para los cruces con Kawisari, la frecuencia de cuajamiento osciló entre 75,3% y 92,9%, mientras que para los cruces con *C. liberica* estos valores estuvieron entre 58,9% y 88,2%.

Tabla 3. Comparación de la frecuencia de cuajamiento y la eficiencia de cruzamiento correspondientes a las polinizaciones realizadas en enero y febrero de 2011, involucrando cuatro cruzamientos inter-específicos con la especie *C. liberica*.

Cruzamiento	Época ^{1/}	Frecuencia de cuajamiento (%)	Significancia ^{2/}	Eficiencia de cruzamiento (%)	Significancia ^{2/}
Línea CX-2848 x Kawisari Int. No.409	Ene 2011	79,2	0,032 *	59,1	0,004 **
	Feb 2011	92,9		28,1	
Línea CU-1843 x Kawisari Int. No.1409	Ene 2011	82,5	0,196	46,0	<0,000 **
	Feb 2011	75,3		18,9	
Línea CX-2710 x <i>C. liberica</i> (No. 21-25)	Ene 2011	77,8	0,361	23,1	0,005 **
	Feb 2011	75,5		5,7	
Línea CU-1827 x <i>C. liberica</i> (No. 21-25)	Ene 2011	88,2	0,004 **	53,2	<0,00 **
	Feb 2011	58,9		11,1	

^{1/} Período en el cual se realizó la polinización artificial

^{2/} Valor de probabilidad según prueba de t para muestras con varianza desigual

*, **, Valores significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95% y del 99%, respectivamente.

La eficiencia de cruzamiento por su parte mostró diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las dos épocas, para todos los cruces estudiados, sugiriendo que independientemente del componente genético (es decir, nivel de introgresión entre los progenitores), existe un efecto consistente de las condiciones climáticas sobre esta variable. Las eficiencias de cruzamiento estuvieron entre 18,9% y 59,1% para los cruces con Kawisari, mientras que para los cruces con *C. liberica* estos valores variaron entre 5,7% y 53,2%.

El análisis de la temperatura, brillo solar y precipitación imperante en los meses de enero y febrero del 2011, mostró diferencias particularmente marcadas para el brillo solar y la precipitación (Tabla 4). Mientras el brillo solar descendió en promedio 3 h.día⁻¹ entre enero y febrero, la precipitación media sufrió un incremento de diez veces pasando de 1 mm.día⁻¹ a 11 mm.día⁻¹. Al analizar detalladamente el comportamiento de la lluvia, se aprecia que durante los 5 días que precedieron a la polinización de febrero ocurrió un incremento marcado alcanzándose 97 mm acumulados, con relación al mismo periodo de enero 2011, cuando sólo se observaron 9 mm acumulados (Figura 6). De acuerdo con esto, es posible suponer que el incremento marcado de las lluvias justo antes de la polinización haya afectado la eficiencia de los cruzamientos,

independiente del efecto genético debido a la introgresión. Los resultados muestran una reducción significativa en la eficiencia de los cruzamientos como producto de las lluvias que se presentaron durante el mes de febrero del 2011. Es posible que los aguaceros torrenciales que ocurrieron días antes hayan afectado algunas flores de los árboles previamente preparados y hayan dificultado de manera importante la aplicación del polen durante la polinización. Si bien no se tomaron datos de las condiciones de humedad del polen previo a la polinización, es muy posible que el exceso de lluvias haya afectado el desarrollo normal del proceso de polinización. Estudios más precisos son necesarios para determinar de qué manera las condiciones de humedad estarían incidiendo en la dispersión y penetración del polen durante los cruzamientos.

Si bien no hubo diferencias importantes entre las dos épocas con respecto a las condiciones climáticas posteriores a la polinización, existe evidencia que muestra que los excesos de humedad, sombrío y/o temperatura, pueden llevar al secamiento de flores y frutos en estados muy tempranos, un disturbio que generalmente se asocia con el incremento de agentes patogénicos, como hongos del género *Colletotrichum* (1, 24), lo cual aparentemente no fue el caso en este trabajo.

Tabla 4. Condiciones climáticas imperantes en la Estación Central Naranjal (Chinchiná), durante las dos épocas de polinización (enero y febrero de 2011) comparadas en este trabajo. Para cada variable se presentan los valores promedios de 11 días (5 días antes, durante y 5 días después de la polinización).

Época	Temperatura (°C)			Humedad Relativa (%)	Brillo solar (h)	Precipitación (mm)
	Máx.	Mín.	Media			
Enero 2011	27,5	17,0	21,3	79 (74 - 83)	7 (3 - 10)	1 (0 - 5)
Febrero 2011	26,0	16,9	20,6	83 (72 - 92)	4 (1 - 9)	11 (0 - 61)

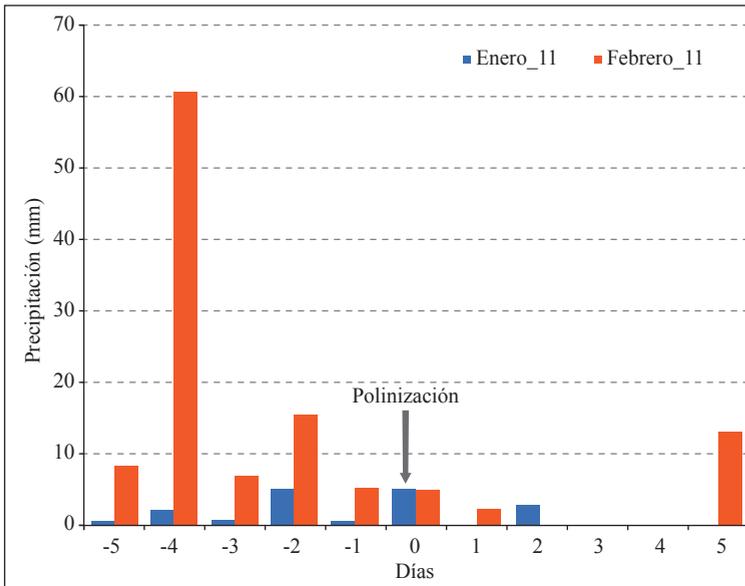


Figura 6. Comportamiento de la precipitación antes, durante y después de las polinizaciones realizadas en enero y febrero del 2011, en la Estación Central Naranjal (Chinchiná).

En conclusión, en este estudio se puso en evidencia el efecto de la introgresión tanto sobre la frecuencia de cuajamiento de las flores como sobre la eficiencia de los cruzamientos realizados. El conjunto de resultados muestra que a mayor introgresión de la especie *C. liberica*, menor es la eficiencia de los cruzamientos con genotipos arabigos. Los genotipos BA-2 y S.795 fueron los que mostraron una mayor compatibilidad con los Catimores usados como progenitores femeninos, mientras que el S.288 presentó un comportamiento intermedio. Igualmente, se evidenció que la eficiencia del cruzamiento se relaciona de manera directa con la frecuencia de cuajamiento observada un mes después de la polinización, excepto en los cruzamientos interespecíficos, en los cuales se presenta una reducción significativa de la eficiencia posterior al cuajamiento, producto del aborto prematuro de los frutos en sus primeras etapas de formación.

Si bien en este trabajo se analizaron poblaciones introgresadas por *C. liberica*,

este mismo comportamiento puede esperarse que ocurra para cruzamientos entre *C. arabica* y otras especies diploides. Los trabajos pioneros realizados por Charrier (7) y Le Pierrès (15), entre otros, sugieren que los cruzamientos interespecíficos involucrando otras especies como *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. congensis*, *C. kapakata* o *C. stenophila*, muestran un comportamiento meiótico muy parecido, lo que se traduce en valores de fertilidad igualmente similares. Al comparar el número de conjugaciones meióticas bivalentes en híbridos triploides entre estas especies y *C. arabica*, se observan en promedio 8 a 10 configuraciones de este tipo, lo que hace suponer la existencia de homologías genéticas no despreciables entre los cromosomas de estas especies. Dada la proximidad genética de las diferentes especies de café (3, 7, 23), es de suponer que las variaciones en fertilidad podrían estar más relacionadas con diferencias estructurales que con diferencias genéticas entre los cromosomas de las especies involucradas.

Finalmente, la comparación de diferentes cruzamientos realizados bajo las condiciones de Chinchiná, en dos meses contrastantes por la presencia de precipitaciones, mostró que la lluvia puede llegar a ser un factor limitante que afecta el buen desarrollo de los cruzamientos y su eficiencia. En este sentido, sería importante que al momento de planear jornadas de polinización, se tenga en cuenta el efecto que la alta pluviosidad puede tener sobre el éxito final de los cruzamientos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Señor Augusto Vera de la Disciplina de Mejoramiento Genético por su colaboración en la realización de los cruzamientos y el suministro oportuno de los datos de campo, así como al Señor Luis G. Henao de la Disciplina de Agroclimatología, por el suministro de los datos climáticos.

LITERATURA CITADA

1. ARCILA, J. Anormalidades en la floración del café. Chinchiná : Cenicafé, 2004. 8 p. (Avances Técnicos No. 320).
2. BERTHAUD, J. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: Méthode de test et déterminisme génétique. Café cacao, thé 24:267-274. 1980.
3. BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. p. 1-42. En: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. Coffee. London : Elsevier applied science, 1988. 334 p.
4. CAPOT, J. L'amélioration du caféier Robusta en Côte d'Ivoire. Café cacao, thé 21:233-244. 1977.
5. CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica* L. p. 129-166. En: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. Agronomy. London : Elsevier applied science, 1988. 334 p.
6. CARVALHO, A.; MÓNACO, L.C. The breeding of arabica coffee. p. 198-202. En: FERWERDA, F.P.; WIT, F. Outlines of perennial crop breeding

in the tropics. Wageningen : Veenman & Zonene, 1969.

7. CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (Mascarocoffea): Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Paris : ORSTOM, 1978. 224 p.
8. CRAMER P., J.S. A review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba : IICA, 1957. 262 p.
9. DEMARLY, Y. Génétique et amélioration de plantes. Paris : Masson publish, 1977. 287 p.
10. JIMÉNEZ, W.; CASTILLO, J. Observaciones sobre la polinización de *Coffea arabica* L., en la zona cafetera central de Colombia. Cenicafé 27:51-66. 1976.
11. HERRERA P., J.C.; COMBES, M.C.; CORTINA G., H.A.; ALVARADO A., G.; LASHERMES, P. Gene introgression into *Coffea arabica* by way of triploid hybrids (*C. arabica* x *C. canephora*). Heredity 89:488-494. 2002.
12. HERRERA P., J.C.; ROMERO, J.V.; CAMAYO, G.C.; CAETANO, C.M.; CORTINA, H. Evidence of intergenomic relationship in triploid hybrids of coffee (*Coffea* sp.) as revealed by meiotic behavior and genomic in situ hybridization. Tropical plant biology 5(3):207-217. 2012.
13. KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; DEWENTER, I.S.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the royal society of biological sciences 274:303-313. 2007.
14. KRUG, C.A. Controle da polinização nas flores do cafeeiro. Sao Paulo : Instituto agronômico de Campinas, 1935. 12 p. (Boletín Técnico No. 15).
15. LE PIERRES, D. Etude des hybrides interspécifiques tétraploïdes de première génération entre *Coffea arabica* et les caféiers diploïdes. Paris : Université Paris, 1995. 298 p. Thèse doctorat.
16. NARASIMHASWAMY, R.L. Arabica selection S.795 its origin and performance: A study. Indian coffee research 24:197-204. 1960.
17. NARAYANAN, B.T. Sixth and seventh annual reports of the research department of the Indian coffee board (1952-53, 1953-54). Karnataka : Coffee board, 1954. 91 p.

18. POSKIN, J.H. Etude d'un hybride Robusta-Arabica. p. 419-423. En: Semaine agricole Yangambi: C.R. Congo : Institut national agronomique, 1947.
19. PRAKASH, N.S.; MARQUES, D.V.; VARZEAU, M.P.; SILVA, M.C.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P. Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. Theoretical and applied genetics 109:1311-1317. 2004.
20. RICHARDSON, A.C.; ANDERSON, P.A. Hand pollination effects on the set and development of cherimoya (*Annona cherimola*) fruit in a humid climate. Scientia horticulturae 65:273-281. 1996.
21. SALAZAR, M.R.; ARCILA, J.; RIAÑO, N.; BUSTILLO, A.E. Crecimiento y desarrollo del fruto de café y su relación con la broca. Chinchiná : Cenicafé, 1993. 4 p. (Avances Técnicos No. 194).
22. STOFFELS, E. La sélection du caféier arabica a la station de Mulungu. Congo : INEAC, 1936. 41 p.
23. SYBENGA, J. Genetics and cytology of coffee: A literature review. p. 209-3016. En: MARTINUS, N. The Hague. Turrialba : IIAS, 1961.
24. VALENCIA, G.; ARCILA, J. Secamiento y caída de frutos tiernos de café. Chinchiná : Cenicafé, 1975. 2 p. (Avances Técnicos No. 40).
25. WALYARO, D.J.; VAN DER V., H. Pollen longevity and artificial cross-pollination in *Coffea arabica* L. Euphytica 26:225-231. 1977.
26. WERTHEIM, S.J. Methods for cross pollination and flowering assessment and their interpretation. Acta horticulturae 423:237-239. 1996.