

# CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA Y MORFOLÓGICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS ENTRE *C. arabica* Y LAS ESPECIES DIPLOIDES *C. liberica* y *C. eugenioides*<sup>1</sup>

Juan Vicente Romero\*; Gloria Cecilia Camayo-Vélez\*, Laura Fernanda González-Martínez\*; Hernando Alfonso Cortina-Guerrero\*\*; Juan Carlos Herrera-Pinilla\*\*

## RESUMEN

ROMERO, J.V.; CAMAYO V., G.C.; GONZÁLEZ M., L.F.; CORTINA G., H.A.; HERRERA P., J.C. Caracterización citogenética y morfológica de híbridos interespecíficos entre *C. arabica* y las especies diploides *C. liberica* y *C. Eugenioides* Cenicafé 61 (3):206-221. 2010

A pesar de los avances del mejoramiento genético del café (*Coffea arabica*) las variedades americanas continúan expuestas a diferentes factores limitantes, a causa de su elevada uniformidad genética. Una vía de introgresión de nuevos genes es la hibridación interespecífica la cual ha sido poco usada debido al desconocimiento de los mecanismos que limitan el flujo genético entre especies. El objetivo de este estudio fue caracterizar dos poblaciones híbridas derivadas del cruzamiento entre *C. arabica* y dos especies de interés para el mejoramiento del cultivo en Colombia: *C. liberica* y *C. eugenioides*. Con el fin de verificar la condición híbrida, cada individuo fue analizado mediante métodos citológicos y moleculares. Adicionalmente se evaluaron caracteres morfológicos descriptivos relacionados con hojas, flores y frutos, los cuales se compararon con las accesiones parentales utilizadas para los cruzamientos. Todas las plantas presentaron un cariotipo homogéneo (cromosomas entre 0,8 a 2,2  $\mu\text{m}$ ), con 33 cromosomas. Dos marcadores microsatélites permitieron confirmar su carácter híbrido. El análisis morfológico reveló un vigor importante en la mayoría de individuos, donde la prevalencia de fenotipos intermediarios con respecto a los progenitores fue la regla. Mientras algunos caracteres (tamaño de la flor y de entrenudos), mostraron valores promedios mayores que los de los progenitores, otros, como el tamaño de las hojas, mostraron similitud con el parental arábigo, algo que podría ser ventajoso al momento de querer restaurar rápidamente el fenotipo de la especie cultivada.

**Palabras clave:** Híbridos triploides, cariotipo, introgresión.

## ABSTRACT

In spite of important results of the coffee (*Coffea arabica*) breeding programs in America, cultivated varieties remain exposed to several biotic and abiotic factors limiting crop production. Interspecific hybridization represents a useful way to introgress "good" genes into new varieties, however lack of information on gene flow mechanisms, remains as the main difficulty. The aim of this study was to characterize two hybrid populations derived from crosses between the cultivated *C. arabica* and the diploid species *C. liberica* and *C. eugenioides* which carry interesting traits for the Colombian coffee breeding program. The hybrid status of studied plants was confirmed through cytological and molecular methods. Further, using morphological descriptive traits (related to leaves, flowers and fruits), a comparison between hybrids and parental species was done. Results showed that hybrids exhibited homogeneous karyotypes (chromosome length ranged from 0,8 to 2,2  $\mu\text{m}$ ) with 33 chromosomes. Morphological analyses revealed a high hybrid vigor among the F1 plants with quite predominance of intermediate forms. While some morphological traits in hybrids overcome values in the parents, other traits like leaf size, showed significant proximity to *C. arabica*. Such phenotypic closeness with arabica would be important during future reciprocal selection when recover the phenotype of the cultivated species is the goal.

**Keywords:** Triploid hybrids, karyotyping, gene introgression.

<sup>1</sup> Estos resultados hacen parte del trabajo de tesis del primer autor para optar al título de M.Sc. en Ciencias Agrarias línea de Fitomejoramiento de la Universidad Nacional sede Palmira.

\*Investigador Asociado

\*\*Investigador Científico II, respectivamente. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

El café arábigo (*Coffea arabica* L.) es una planta de tipo arbustivo, originaria de las regiones altas del África central, particularmente del Sureste de Etiopía y Norte de Kenia (35, 45). Su origen parece ser el resultado de una hibridación natural entre dos formas ancestrales, próximas a las especies *C. eugenioides* y *C. canephora* (23, 25). Producto de ese origen híbrido, el genoma actual de *C. arabica* está compuesto por dos subgenomas poco diferenciados, que le confieren su carácter de alopoliploide segmental (20, 24, 25, 42). A pesar de ser la única especie tetraploide ( $2n=4x= 44$ ) del género *Coffea*, su comportamiento meiótico es regulado y de tipo disómico, lo que significa que prevalece el apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos (33, 34).

Aunque el género *Coffea* incluye más de 100 especies descritas, sólo dos de ellas, *C. canephora* y *C. arabica*, tienen una participación mayoritaria en el mercado mundial, con el 30% y 70% de la producción mundial, respectivamente. En Colombia, la especie tradicionalmente cultivada es *C. arabica*, la cual se distingue por la suavidad y calidad de su bebida, que le confieren un mayor valor comercial.

Las variedades de café arábigo tradicionalmente cultivadas en el mundo, y particularmente en América, se caracterizan por una gran uniformidad genética, producto de varios factores, entre los cuales se cita su tipo de reproducción (preferencialmente autógeno) y el modo particular de dispersión, a partir de su centro de origen (3, 12). Como consecuencia, dichas variedades muestran una gran susceptibilidad a las diferentes enfermedades y plagas que atacan el cultivo.

Ante este panorama, a partir de la década de los 60's los programas de mejoramiento debieron recurrir a la incorporación de nuevos genes, particularmente relacionados con la

resistencia a la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), derivados de forma directa (por cruzamientos interespecíficos), o indirecta (a través del Híbrido de Timor), de la especie diploide *C. canephora*.

Sin embargo, el escenario actual de la caficultura, en el cual juegan factores como los riesgos fitosanitarios potenciales, la necesidad de adaptación a ambientes específicos y las exigencias del mercado en cuanto a diferenciación por calidad de la bebida, hace cada vez más necesaria la introducción de nuevas características, en las variedades que se cultivarán en el mediano y largo plazo. Para alcanzar este objetivo es necesario recurrir a los bancos de germoplasma de café disponibles en el mundo, uno de los cuales se encuentra en Colombia bajo el cuidado de Cenicafé. Este recurso genético establecido en 1940, conocido como la Colección Colombiana de Café (CCC), posee actualmente más de 1.000 introducciones, entre las cuales se destacan las derivadas de la especie *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* (18).

Si bien existe una gran riqueza genética, su explotación por parte del programa de mejoramiento ha sido muy limitada, en buena parte por el desconocimiento de sus características fenotípicas y de los mecanismos que determinan el flujo de genes entre especies. En este sentido, el género *Coffea* tiene como ventaja la posibilidad de obtener híbridos interespecíficos entre la mayoría de especies que lo conforman, lo cual sugiere que todas ellas comparten un mismo genoma de base, producto de un origen monofilético (6).

El primer paso en la incorporación o "introgresión" de nuevos genes en la especie cultivada *C. arabica*, es la producción de híbridos interespecíficos y su adecuada caracterización, tanto desde el punto de vista morfológico como reproductivo. Esta

información es la base para diseñar estrategias de utilización adecuadas, que permitan una introgresión exitosa de una o varias características de interés. En Colombia, se han realizado varios intentos de introgresión de genes mediante la producción de híbridos triploides, los cuales una vez logran regular su fertilidad, pueden ser incorporados en una estrategia de mejoramiento genético. Es así como a principios de 1970, la disciplina de mejoramiento genético de Cenicafé inició un programa de hibridación interespecífica entre las especies *C. arabica* y *C. canephora*, que dio como resultado un número importante de líneas, con excelentes características agronómicas y elevada resistencia a la roya (2, 37).

Si bien se obtuvieron muchos otros híbridos por cruzamientos dirigidos entre *C. arabica* y varias especies diploides de interés (ej. *C. kapakata*, *C. racemosa*, *C. congensis*, *C. stenophylla*, *C. eugenioides* y *C. liberica*), ninguno de ellos se ha utilizado dentro de las estrategias de mejoramiento que sigue la disciplina de mejoramiento genético, a pesar de poseer características de interés para el cultivo (40).

Dentro de las muchas especies diploides de interés potencial para el mejoramiento de *C. arabica* están *C. eugenioides* y *C. liberica*. La primera de ellas guarda una relación filogenética estrecha con *C. arabica* dada su posible participación como ancestro materno (25); adicionalmente, posee elevada tolerancia a condiciones desfavorables de suelo y bajos contenidos de cafeína en el grano (0,2%), lo cual la hace interesante desde el punto de vista del mejoramiento de la calidad (38, 32). La especie *C. liberica*, por su parte, muestra un alto contenido de ácidos clorogénicos en sus granos, que juegan un papel importante en la producción de aromas en la bebida. Además de su reconocida resistencia a la roya, *C. liberica* se caracteriza por poseer tolerancia

a bajas temperaturas y un sistema radical vigoroso, que la hace tolerante al ataque de nematodos (1). Finalmente, los estudios recientes muestran que esta especie parece tener un efecto de antibiosis, en respuesta al ataque de la broca del café (*Hypothenemus hampei* (Ferrari)), que se traduce en una reducción significativa en la oviposición del insecto en el grano (43, 44).

Dada su importancia y la potencial utilidad para el programa de mejoramiento genético de Cenicafé, el objetivo del presente estudio fue el de caracterizar diferentes poblaciones híbridas derivadas del cruzamiento entre la especie cultivada *C. arabica* y las formas diploides *C. liberica* y *C. eugenioides* presentes en la CCC. Con el fin de verificar la condición híbrida, cada individuo fue analizado mediante métodos citológicos y moleculares. Adicionalmente se evaluaron una serie de caracteres morfológicos descriptivos, los cuales se compararon con las accesiones parentales utilizadas para los cruzamientos. Los resultados se discuten desde una perspectiva de aprovechamiento a mediano y largo plazo de estos híbridos dentro del programa de mejoramiento genético que adelanta actualmente Cenicafé.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Tanto los híbridos interespecíficos como las especies estudiadas, pertenecen a la Colección Colombiana de Café, ubicadas en la Estación Central Naranjal, de Cenicafé, ubicada en el municipio de Chinchiná (Caldas). Se evaluaron plantas adultas de las especies *C. arabica*, variedad Caturra y tres progenies de la variedad Colombia (36), *C. liberica* Bull ex Hiern (variedades libérica y dewevrei), *C. eugenioides* Moore, y los híbridos entre *C. arabica* x *C. liberica* (AxL) y *C. arabica*

x *C. eugenioides* (AxE). La genealogía y el número de plantas de cada genotipo se presentan en la Tabla 1.

La población híbrida AxL se obtuvo en 1990, producto del cruzamiento dirigido entre la variedad Caturra y plantas pertenecientes a los dos grandes grupos taxonómicos de la especie *C. liberica*: el grupo Libérica (var. libérica y var. abeocutae) y el grupo Dewevrei (var. arawinensis y var. excelsa). Los híbridos AxE se obtuvieron de cruzamientos realizados en 1996, entre tres líneas de *C. arabica* var. Colombia (BK.396, BH.904 y CO.832) y dos introducciones de la especie *C. eugenioides*.

## Determinación de la condición híbrida

Para establecer el carácter triploide de las plantas AxL y AxE, se contó el número de cromosomas de cada planta y se analizó su cariotipo con relación al de las especies parentales. Para ello, se tomaron células somáticas en metafase a partir de meristemos radicales. Las células fueron colocadas en una solución citostática ( $\alpha$ -hidroxiquinolina 0,05%), fijadas de Carnoy (3 partes de etanol: 1 parte de ácido acético glacial), y posteriormente, digeridas en una solución enzimática compuesta de celulasa (Sigma C-1184 y Phytotechnology Labs C224) y pectinasa (Sigma P4716-10KU) en búfer citrato

**Tabla 1.** Genealogía de las especies parentales y de los híbridos interespecíficos evaluados.

Cruzamiento	Genealogía de especies	Genealogía de los híbridos	No. de plantas
<i>C. arabica</i> x <i>C. eugenioides</i>	<i>C. arabica</i>		
	• línea CO.832*		
	• línea BK.396*		
	• línea BH.90*	CO.832 x Int.861-865	3
	<i>C. eugenioides</i>	BK.396 x Int.951-960	7
	• Int.861-865		
	• Int.951-960		
<i>C. arabica</i> x <i>C. liberica</i>	<i>C. arabica</i>		
	• Var. Caturra Rojo (CR)	CR x Abeocutae	4
	• Var. Caturra Amarillo (CA)	CA x Excelsa (CCC.1028)	1
	<i>C. liberica</i>	CR x Arawinensis (CCC.1025)	1
	• Var. Abeocutae	CA x Excelsa (CCC.1028)	1
	• Var. Arawinensis (CCC.1025)	CR x Excelsa (CCC.1026)	1
	• Var. Liberica (CCC.769)	CR x Excelsa (CCC.1027)	1
	• Var. Excelsa (CCC.1026)	CR x Liberica (CCC.769)	1
	• Var. Excelsa (CC.1027)		
	• Var. Excelsa (CCC.1028)		

\* Progenies avanzadas de variedad Colombia

(pH 5,0). Una vez extendidos los cromosomas sobre una lámina porta-objetos, éstas fueron teñidas con un colorante fluorescente (DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato). Las láminas montadas se examinaron bajo un microscopio motorizado, equipado con un dispositivo de epifluorescencia (Nikon Eclipse 90i). Un mínimo de 20 metafases independientes fueron analizadas por cada genotipo. Tanto el tamaño de los cromosomas como los cariotipos de los respectivos híbridos fueron construidos partir de imágenes seleccionadas de las mejores metafases, utilizando las herramientas de análisis de imágenes, disponibles en el módulo KARYO del programa LUCIA (Nikon).

Adicionalmente, y con el fin de establecer la condición de verdaderos híbridos, las plantas AxL y AxE fueron evaluadas con marcadores moleculares específicos. Para ello, se seleccionaron nueve marcadores microsátélites, con base en el polimorfismo exhibido respecto a las dos especies parentales, *C. liberica* y *C. eugenioides* (27). En la Tabla 2 se presenta la secuencia y tamaño de los iniciadores (*primer*), correspondientes a los diferentes microsátélites evaluados. El ADN genómico fue extraído de las plantas híbridas y de sus respectivos parentales,

mediante el método modificado para café, basado en Bernatsky y Tanksley (5). Las condiciones de amplificación por PCR fueron las mismas utilizadas por López y Moncada (27), mientras que la visualización de los marcadores se hizo por separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (6%), siguiendo la metodología propuesta por Combes *et al.* (17).

### Caracterización morfológica

Las diferencias morfológicas entre los individuos híbridos y sus parentales se cuantificaron usando diferentes variables relacionadas con las ramas, las hojas, los frutos y las flores, en diez plantas por genotipo. Adicionalmente, se registró el porte de la planta así como el color de las hojas jóvenes. Para cada individuo se determinó la longitud (cm), de cinco entrenudos seleccionados en la parte media de cuatro ramas. Igualmente, se midió el largo (L) y el ancho (A) (cm), de diez hojas maduras. Estas evaluaciones se hicieron sobre ramas y hojas ubicadas en la parte media de cada árbol. Con estas mediciones se calculó el área foliar, AF (LxA), así como el índice de la forma de la hoja, IFH (L/A).

**Tabla 2.** Marcadores microsátélites utilizados para la caracterización molecular de los híbridos.

Marcador	Secuencia primer 3' (F)	Secuencia primer 5' (R)	Producto PCR esperado (pb)
FRF 9-3	TCCATCGTTTACGATTTGTC	GTCATCTATTTGTGAGCTTGG	161
CA12	ATTTTCGAGCTCGCAAGTGG	TCTGTTATTATACCCGGCGC	205
CA334	AGCCACCACAGGAAGTTTCA	GGGAGTGAAAGACATCAGGTG	154
GA69	TGGTGGAGTGGCTTTGATTGATG	GCAACTTATGAGCCTAATCC	145
GA1210	AGCAACTTCGCCAGTCATTA	GCGGGTCTTATTCAACGTATAC	340
1AF-GAA	CATGCATGTCCTGTGCATGT	GCAGTCACATGACCAAATGC	
GA499	TATGTCTCTAACTTTCTTATTTT	CACTCTCCGCCCTATTATGTT	183
GA968	AGCCACTTGTCCAAGTATAGGG	CAA AATTGCTCCGACATTCC	173
GA1056	ACCAATTCCTGTCAAGTCAGG	TGGCCATGAGAATAGGCATC	180

Durante la época de floración, en total se muestrearon 40 botones florales en estado de preantesis, sobre todos los individuos pertenecientes a cada uno de los grupos analizados (especies parentales e híbrido), a los cuales se les midió la longitud (mm), tomada a partir de la base de la corola.

De manera similar, se muestrearon 40 frutos entre los individuos de cada grupo de estudio, a los cuales se les determinó el largo (L), el diámetro de las caras ancha (D) y angosta (d) del fruto (cm), y el peso (g). Con base en estas estimaciones se calculó el índice del tamaño del fruto, ITF (LxDxd), así como el índice de la forma del fruto, IFF (L/D). Adicionalmente, se midió el diámetro del disco del ombligo por cada fruto muestreado (mm).

Esta información se analizó mediante estadísticos descriptivos (promedios e intervalos de confianza para la media,  $p > 0,05$ ) y pruebas de comparación de medias (Duncan, 5%), con el fin de estimar las diferencias entre genotipos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización citológica y molecular de los híbridos

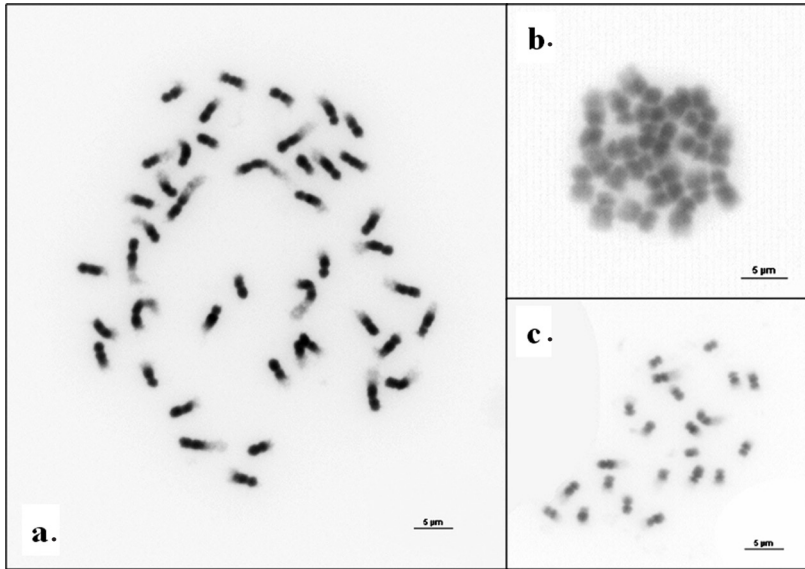
El cariotipo de las especies parentales *C. arabica*, *C. liberica* y *C. eugenioides*, reveló diferencias en su tamaño, las cuales habían sido reportadas por Bouharmont (8). Para *C. arabica* se encontró que los cromosomas tenían un tamaño homogéneo con un promedio de longitud de 2,3  $\mu\text{m}$  y un rango entre 1,5 y 3,0  $\mu\text{m}$ . Estas mediciones son muy próximas a las realizadas por Clarindo y Carvalho (16), utilizando una técnica mejorada para la obtención de cromosomas metafásicos de *C. arabica*. Según estos autores, en esta especie se observaron cromosomas con

longitudes entre 1,26 y 3,53  $\mu\text{m}$ . Las escasas diferencias con los datos presentados en esta investigación, están posiblemente ligadas a la técnica utilizada para extender los preparados cromosómicos. Las evaluaciones realizadas en *C. liberica* muestran la presencia de cromosomas más pequeños (1,5  $\mu\text{m}$ , rango 1,0-2,0), mientras que en *C. eugenioides* se observaron cromosomas más grandes, con una media de 2,6  $\mu\text{m}$  y un rango entre 1,3 y 4,4  $\mu\text{m}$  (Figura 1).

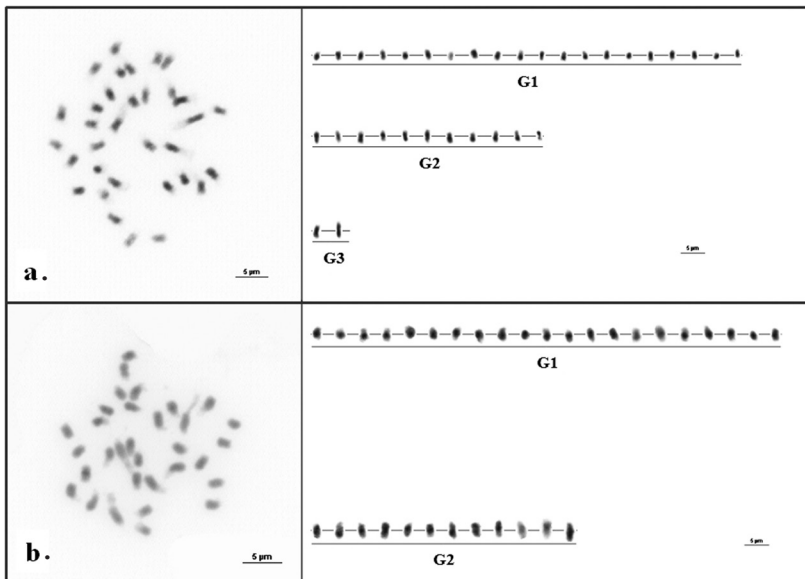
Al examinar los híbridos interespecíficos se observó que todos ellos presentaron 33 cromosomas somáticos, tal como se esperaba por su condición híbrida. El análisis detallado de sus cariotipos mostró además la presencia de cromosomas con diferentes tamaños, pudiéndose conformar varios grupos, tal como se muestra en la Figura 2. Para el híbrido AxL se observa la presencia de tres grupos de cromosomas (G1, G2 y G3, Figura 2a), siendo su tamaño promedio de 1,3  $\mu\text{m}$  (rango 0,8-2,1  $\mu\text{m}$ ). En el híbrido AxE, en cambio, se observa una mayor homogeneidad en el tamaño de los cromosomas, distinguiéndose solo dos grupos (G1 y G2, Figura 2b), cuyo tamaño promedio fue de 1,5  $\mu\text{m}$  (rango 1,0-2,2  $\mu\text{m}$ ).

Sin embargo, a pesar de que se lograron realizar estas agrupaciones, las diferencias en tamaño cromosómico entre las especies parentales, no fueron lo suficientemente importantes para poder establecer su origen parental en los híbridos estudiados. Esta homogeneidad morfológica es una característica bien conocida del género *Coffea* y continúa siendo una de las principales limitaciones para el desarrollo de la citogenética en este grupo (41).

Dadas las limitaciones de los análisis citológicos, para determinar el carácter híbrido de las plantas estudiadas, se decidió complementar este análisis con evaluaciones



**Figura 1.** Extendidos cromosómicos correspondientes a las tres especies estudiadas. (a) *C. arabica*, (b) *C. eugenioides*, (c) *C. liberica*.



**Figura 2.** Análisis cariológico de los híbridos *C. arabica* x *C. liberica* (a), y *C. arabica* x *C. eugenioides* (b). Para cada híbrido se presenta una placa metafásica tipo, con su respectivo cariograma. En cada caso, los cromosomas fueron separados en diferentes grupos morfológicos (G1, G2 y G3) de acuerdo con su tamaño.

moleculares basadas en marcadores de tipo microsatélites, los cuales representan polimorfismos en longitud, ligados a secuencias de tipo repetitivo, muy comunes en el genoma de plantas y animales. Con base en información previa (27), se seleccionaron nueve marcadores microsatélites, los cuales fueron evaluados en los padres y sus respectivos híbridos. Luego de su amplificación, solo dos de ellos presentaron bandas polimórficas claras entre las tres especies parentales, las cuales se evidenciaron también en los híbridos. En consecuencia, estos marcadores fueron seleccionados para establecer la condición híbrida de las plantas estudiadas. Como se aprecia en la Figura 3, los marcadores GA\_1056 y AF\_GAA, produjeron bandas polimórficas diferenciales entre *C. arabica* y las especies parentales *C. eugenioides* (Figura 3a) y *C. liberica* (Figura 3b), respectivamente. La amplificación conjunta de las bandas polimórficas parentales en los individuos AxE y AxL permitieron finalmente confirmar de manera inequívoca su origen híbrido.

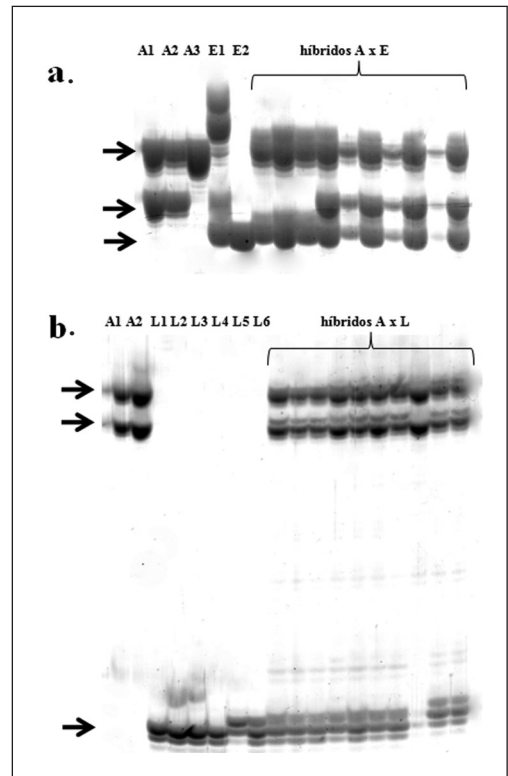
### Descripción morfológica

Aunque las tres especies analizadas en este trabajo poseen una base genética común a todas las especies de café conocidas, existen diferencias genéticas, fenológicas y adaptativas que las hacen muy contrastantes. Tales diferencias resultan interesantes dentro de una estrategia de mejoramiento genético por hibridación, dado que son ellas la fuente principal de la variabilidad genotípica, que el mejorador de café utiliza para seleccionar los individuos de mayor interés.

*Coffea arabica*, es una especie originaria de la región montañosa del Sureste de Sudán y Norte de Kenia, donde se han encontrado las formas silvestres más primitivas. Es una especie de zonas altas, típicamente arbustiva, caracterizada por sus hojas oblongo-lanceoladas, de color verde oscuro brillante

(48). En la variedad Caturra los entrenudos son significativamente más cortos, lo que le confiere un aspecto muy compacto característico de esta variedad de café. Las inflorescencias son en glomérulo y cada una tiene 2 a 3 cimas por axila, con 2 a 4 flores por cima. Cada botón floral posee un cáliz compuesto de cinco sépalos blanco crema (4, 9).

La especie *C. liberica*, por su parte, es originaria de regiones intertropicales bajas del centro y occidente del continente africano.



**Figura 3.** Patrones de segregación de los marcadores microsatélites GA\_1056 (a), y AF\_GAA (b), entre la especie *C. arabica* y las especies parentales *C. eugenioides* y *C. liberica*, respectivamente. En cada uno de los geles se muestran tanto las accesiones parentales (A1, A2, A3, E1, E2, L1 a L6) como los híbridos (AxE y AxL) evaluados.



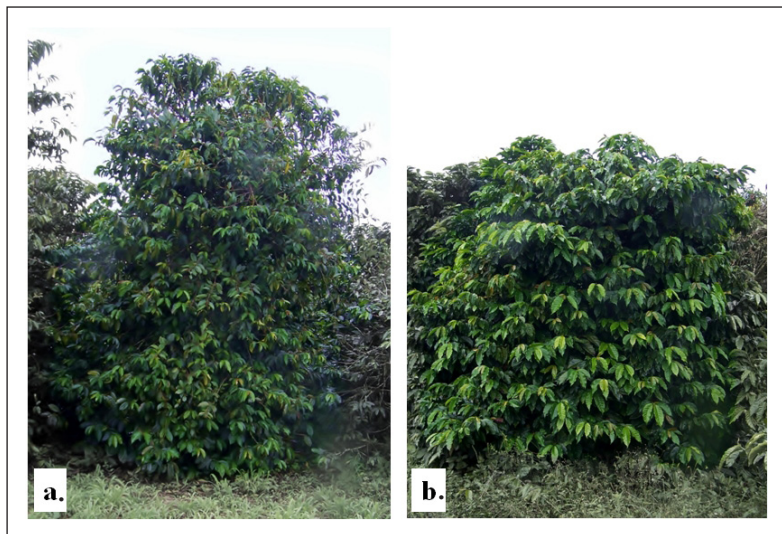
Se caracteriza por ser fenotípicamente muy variable, en buena parte debido a su carácter alógamo compartido con las demás especies diploides de café (7). Son árboles que pueden alcanzar hasta 15 m de altura, con entrenudos largos, dosel de forma cónica y tronco grueso. Sus hojas son ovales-elípticas de textura coriácea, color verde muy oscuro y ápice generalmente redondeado. Las inflorescencias se componen de 2 a 4 cimbras por axila y 5 a 6 flores por cima. Los botones florales poseen un cáliz con 5 o más sépalos, generalmente blancos, con tendencia al rosado.

La especie *C. eugenioides*, se distribuye entre los 1.000 y 2.000 m de altitud, en una extensa región tropical del centro de África, ocupada actualmente por países como la República Democrática del Congo, Burundi, Ruanda, Kenia, Sudán y Tanzania. Fenotípicamente se caracteriza por ser un arbusto cónico, con numerosas ramificaciones, ramas delgadas y hojas pequeñas, de forma lanceolada-acuminada, ligeramente coriáceas. Sus inflorescencias son axilares y las flores

son pequeñas y blancas, conformadas por 4 a 6 sépalos por botón floral (15).

Debido al origen y las características genéticas y reproductivas propias, tanto de la especie cultivada *C. arabica* como de las especies diploides, *C. liberica* y *C. eugenioides*, los mecanismos de intercambio genético que ocurren durante el proceso de hibridación, son necesariamente distintos, lo cual se refleja en la morfología de los híbridos resultantes. Tales híbridos exhiben una variabilidad fenotípica producto del proceso de hibridación. En este contexto, dependiendo del parental diploide utilizado en cada cruzamiento, las poblaciones híbridas obtenidas mostraron características particulares, las cuales se describen con más detalle a continuación:

**Híbridos *C. arabica* x *C. liberica*:** La población de híbridos AxL se caracterizó, en general, por su gran vigor (Figura 4b). Si bien se evidenció una elevada variabilidad en cuanto al porte de las plantas, encontrándose



**Figura 4.** Fenotipo de los híbridos estudiados: *C. arabica* x *C. eugenioides* (a), y *C. arabica* x *C. liberica* (b).

tanto plantas de porte alto como de porte bajo, la mayoría de características fenotípicas medidas mostraron un comportamiento intermedio entre los padres (Figura 5 y Tabla 3). Los árboles híbridos presentaron un tallo leñoso y grueso, con entrenudos relativamente cortos ( $3,5 \pm 0,5$  cm), más próximos a los exhibidos por el parental *C. arabica* ( $3,1 \pm 0,1$  cm).

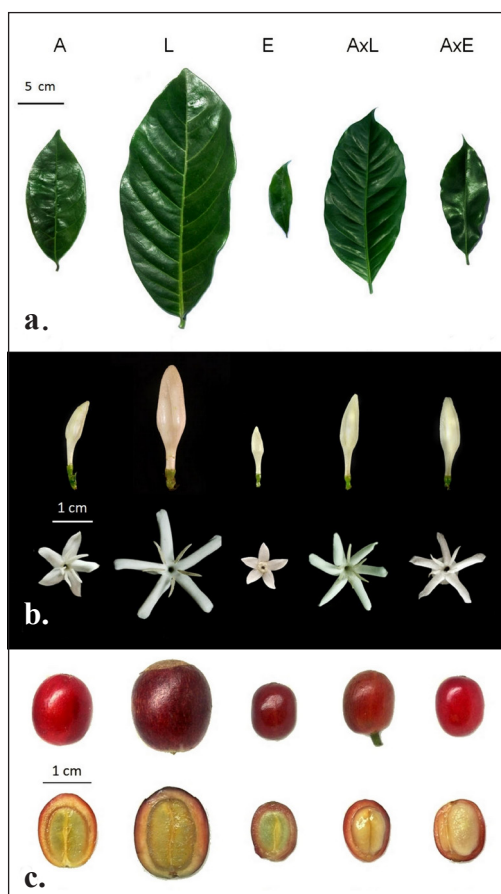
Nueve de los diez híbridos presentaron el cogollo de color verde, al igual que el parental *C. arabica*, mientras que solamente una planta exhibió brote bronce, el cual predominó en la mayoría de las plantas de *C. liberica*, siete de diez. Las hojas adultas fueron de forma elíptica, ligeramente acuminadas, muy similares a las de las dos especies parentales, pero de tamaño intermedio como lo atestiguan los valores promedios de AF (Tabla 3, Figura 5). Sin embargo, al examinar las variables largo (L) y ancho (A) de las hojas, se evidenció una dominancia hacia el parental arábica (Figura 6).

Los botones florales en estos híbridos mostraron entre 5 y 6 sépalos blancos, mientras que su longitud fue intermedia ( $22,1 \pm 1,3$  mm), respecto a la observada en los padres ( $18,3 \pm 1,0$  para *C. arabica* y  $28,4 \pm 0,9$  para *C. liberica*), (Tabla 3, Figura 5).

A diferencia de los otros órganos, el tamaño y forma de los frutos entre los híbridos y sus parentales no son comparables, debido a que los híbridos se caracterizan por exhibir niveles elevados de esterilidad, la cual se traduce en la aparición de frutos anormales (granos vanos, caracoles y monstruos), que suelen tener un desarrollo deficiente del tejido del endospermo (46). Como consecuencia, los híbridos presentaron frutos de menor peso ( $1,4 \pm 0,1$  g) al observado para las especies parentales *C. arabica* ( $2,0 \pm 0,1$  g) y *C. liberica* ( $3,3 \pm 0,3$  g), (Tabla 3,

Figura 6). Igual tendencia se observó para los valores promedios del diámetro del disco del ombligo, los cuales fueron inferiores en todos los individuos híbridos estudiados (Tabla 3).

**Híbridos *C. arabica* x *C. eugenioides*:** A diferencia de los híbridos AxL, los híbridos AxE mostraron ser más homogéneos en cuanto a sus caracteres fenotípicos, en buena medida debido a que las dos especies parentales se asemejan en su porte de tipo arbustivo. Sin



**Figura 5.** Diferencias morfológicas entre las especies parentales (A, *C. arabica*; E, *C. eugenioides*, L, *C. liberica*) y sus respectivos híbridos (AxL y AxE), en relación con la forma y color de las hojas (a), flores (b) y frutos (c).

**Tabla 3.** Valores promedio para las diferentes variables medidas en ramas, hojas, flores y frutos de *C. arabica* (A), *C. liberica* (L), *C. eugenioides* (E) y sus respectivos híbridos interespecíficos.

		<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea liberica</i>	<i>Coffea eugenioides</i>	A x L	A x E
<b>Ramas</b>	<b>Entrenudo (cm)</b>	3,1 (0,2)** c	6,4 (1,0) a	3,0 (0,6) c	3,5 (0,7) bc	3,9 (0,7) b
<b>Hojas</b>	<b>AF* (cm<sup>2</sup>)</b>	76,9 (16,2) c	298,0 (80,4) a	21,2 (3,5) d	126,7 (29,6) b	60,1 (10,2) c
	<b>IFH*</b>	2,4 (0,1) b	2,3 (0,2) b	2,7 (0,2) a	2,4 (0,1) b	2,6 (0,1) a
<b>Flores</b>	<b>Botón (mm)</b>	18,3 (3,4) c	28,4 (3,0) a	12,8 (2,4) d	22,1 (4,2) b	21,7 (2,9) b
<b>Frutos</b>	<b>ITF* (cm<sup>3</sup>)</b>	2,7 (0,6) b	4,9 (1,1) a	1,1 (0,4) d	2,4 (0,7) b	1,6 (0,4) c
	<b>IFF*</b>	1,1 (0,1) b	1,0 (0,1) c	1,2 (0,1) a	1,2 (0,1) a	1,2 (0,1) a
	<b>Omblogo (mm)</b>	3,2 (0,8) b	5,8 (1,5) a	2,4 (0,5) c	2,5 (0,8) c	2,8 (1,0) c
	<b>Peso (g)</b>	2,0 (0,1) b	3,3 (0,3) a	0,8 (0,1) e	1,4 (0,1) c	1,0 (0,1) d

\*AF: Área foliar, IFH: Índice de la forma de la hoja, ITF: Índice del tamaño del fruto, IFF: Índice de la forma del fruto.

\*\* Valores de desviación estándar entre paréntesis.

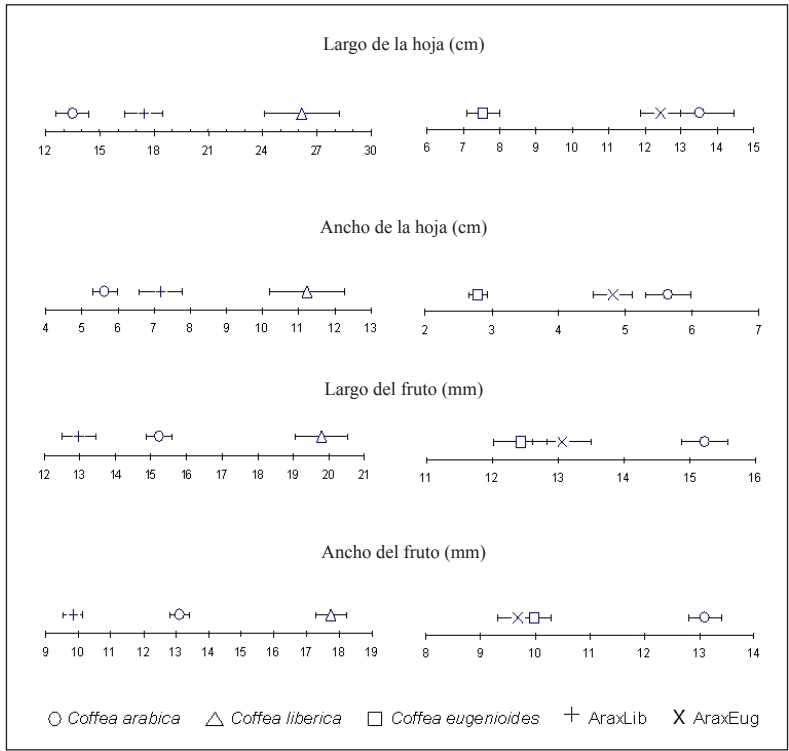
Promedios seguidos de la misma letra no muestran diferencias estadísticas, según prueba de Duncan (P: 0,05).

embargo, muchos de los individuos híbridos mostraron un vigor relativamente importante, que vale la pena destacar (Figura 4a). La aparente heterosis de estos híbridos se reflejó en el tamaño de los entrenudos y la longitud de los botones florales (Tabla 3, Figura 5). La primera característica explica en buena parte el mayor porte que muestran estos híbridos respecto a sus parentales. Si bien el tallo de estos híbridos es delgado, con ramas similares a las de *C. eugenioides*, el tipo de ramificación parece más próximo al de la especie *C. arabica*.

En lo que respecta a las hojas, todos los híbridos AxE presentaron cogollos de color bronce y hojas adultas de forma elíptica y acuminada, de color verde oscuro. Este carácter pareciera ser intermedio, ya que el parental arábica utilizado presenta brotes verdes mientras que *C. eugenioides* se caracteriza por tener brotes de color bronce

claro. El área foliar de los híbridos mostró valores intermedios mientras que la forma de las hojas se aproximó más a las del parental *C. eugenioides* (Tabla 3, Figura 5 y 6). De manera análoga a lo observado para los híbridos AxL, al examinar las variables L y A de las hojas de estos híbridos, se evidenció una dominancia genética clara hacia el parental arábica (Figura 6).

Dada la diferencias de ploidía entre las dos especies parentales, era de esperarse encontrar los mismos problemas de esterilidad observados para los híbridos AxL. En consecuencia, la comparación de las características de los frutos entre padres e hijos no representa una relación real. Sin embargo, a pesar de esto, los híbridos mostraron frutos relativamente intermedios en cuanto al peso ( $1,0 \pm 0,1$  g) y el tamaño del disco del omblogo ( $2,8 \pm 0,3$  mm), mientras que su forma fue ligeramente más alargada (Tabla 3, Figura 5).



**Figura 6.** Comparación de los valores promedio del largo y el ancho de las hojas y de los frutos, entre las especies parentales y sus respectivos híbridos.

A diferencia de los híbridos AxL, los híbridos AxE comparten como parental femenino varias líneas avanzadas de *C. arabica* derivadas de cruzamientos con el Híbrido de Timor. Si bien, estas líneas poseen un fondo genético muy similar al de la variedad Caturra, estos resultados no permiten excluir la posibilidad de que las variaciones observadas estén influenciadas por el origen genético de dichas líneas.

### Híbridos interespecíficos y su potencial de uso

La hibridación interespecífica es una de las herramientas principales del mejoramiento genético vegetal. En el género *Coffea*, la hibridación interespecífica se ha usado con

el fin de obtener combinaciones genéticas de interés, para el mejoramiento de las dos especies de mayor importancia comercial, *C. arabica* y *C. canephora*. Dada la existencia de un genoma de base, compartido por todas las especies de café, el cruzamiento entre las formas diploides, así como entre éstas y la especie tetraploide *C. arabica* ha sido generalmente exitosa (10, 11, 26, 29). Sin embargo, las diferencias tanto en los niveles de ploidía (2x vs 4x) como en las características genéticas propias de cada especie, constituyen barreras reproductivas que reducen de manera importante la fertilidad.

Con excepción de los híbridos entre *C. arabica* x *C. canephora*, la producción

de híbridos interespecíficos artificiales, involucrando otras especies diploides, ha sido muy incipiente. La mayor parte de programas de mejoramiento de *C. arabica* se han inclinado por el uso de unos pocos híbridos naturales espontáneos, entre los que se destaca el famoso Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), el cual se ha convertido en la fuente principal de genes para las variedades de café arábigo creadas hasta hoy. Si bien esta estrategia ha dado lugar a una buena cantidad de material genético de excelentes características, la creciente incidencia de plagas y enfermedades, sumada a una exposición muy prolongada de los mismos genes derivados del Híbrido de Timor sobre extensas áreas cultivadas, representa un peligro potencial para el futuro de la caficultura.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar citológica y morfológicamente diferentes híbridos interespecíficos entre las especies *C. arabica* y los diploides *C. liberica* y *C. eugenioides*, como un primer paso hacia su utilización como puentes genéticos para el mejoramiento de *C. arabica*. Los resultados de este trabajo muestran que los híbridos analizados son morfológicamente intermediarios a sus progenitores, tienen un vigor importante y son capaces de producir semilla, lo cual muestra que la esterilidad de los híbridos F1, no es necesariamente completa como generalmente se piensa (13). Algunas de las características fenotípicas evaluadas (ej. forma y tamaño de la hoja, longitud de los entrenudos y longitud del botón floral) tienden a parecerse más a las exhibidas por el parental arábigo, lo que resulta importante cuando lo que el mejorador quiere es llegar a restaurar rápidamente el fenotipo de la especie cultivada, en este caso *C. arabica*.

La amplia preferencia del mercado por los cafés especiales con bajo contenido de

cafeína, constituye una razón importante para tratar de transferir dicho carácter hacia la especie *C. arabica*. Algunos estudios han tratado de evaluar la posibilidad de obtener plantas con bajos niveles de cafeína, a partir de cruza interespecíficas, involucrando diferentes genotipos, entre ellos la especie *C. eugenioides* (19, 30, 31, 32); sin embargo, los intentos no han sido muy exitosos, en buena medida porque el número de híbridos triploides estudiados, fue siempre muy limitado para retener conclusiones válidas. Adicionalmente, por tratarse de un carácter cuantitativo, la selección de individuos entre generaciones exige una población de buen tamaño (14). En el presente trabajo, si bien el número de híbridos fue mayor al de estudios precedentes, no fue posible determinar los contenidos de cafeína en los híbridos AxE, debido a la poca cantidad de semilla que éstos produjeron en la época del estudio. A pesar de ello, la evidencia de una ausencia de barreras precigóticas en los híbridos F1 formados (datos no mostrados) sugiere la posibilidad real de poder avanzar en las generaciones, con el fin de seleccionar individuos más fértiles, que faciliten el análisis de la cafeína y su potencial de mejoramiento.

Actualmente, las variedades colombianas poseen genes de resistencia a la roya, derivados de *C. canephora* e introgresados a través del Híbrido de Timor. Una estrategia posible, a fin de aumentar dicha variabilidad genética, es introducir genes nuevos como el gen  $S_H3$  derivado de la especie *C. liberica* (47). La utilización de híbridos F1 como material de base para la selección de nuevas combinaciones genéticas, no solo contra la roya sino contra otras plagas como los nematodos de la raíz o la misma broca del café (44), constituyen líneas de investigación cada vez más prioritarias y en las cuales Cenicafé ha empezado a trabajar.

El aprovechamiento completo de los híbridos F1 pasa por superar los problemas de fertilidad. La experiencia en café muestra sin embargo, que esto no ha sido una limitante para otros híbridos interespecíficos como el caso de los híbridos entre *C. arabica* x *C. canephora* (37, 39, 40), o aquellos derivados del cruce entre especies diploides como *C. canephora* y *C. eugenioides* (28). En la mayoría de los casos no parecen existir problemas mayores de afinidad genética o de estructura cromosómica que impidan un flujo adecuado de genes entre las especies (21, 22).

El presente estudio, representa un primer intento de caracterizar integralmente poblaciones de origen híbrido derivadas del cruce entre la especie cultivada *C. arabica* y dos especies diploides (*C. liberica* y *C. eugenioides*) de importancia mayor para la caficultura nacional, dado que algunas de sus características presentan un potencial grande para mejorar la resistencia y la calidad de las variedades de café arábigo. Los trabajos actuales están encaminados a determinar la afinidad genética entre estas especies y sus posibilidades de transferencia de genes por la vía de retrocruzamiento. Se espera que la información generada por este tipo de trabajos, sumada al número creciente de herramientas genéticas y biotecnológicas (ej. mapas genéticos, marcadores moleculares, métodos de análisis bioquímico, marcadores citogenéticos, entre otros), cada vez más disponibles para el café, permitirán desarrollar estrategias de selección más eficientes y rápidas, contribuyendo de manera significativa a la obtención de nuevas variedades mejoradas.

## LITERATURA CITADA

1. AHMAD, J.; VISHVESHWARA, S. *Coffea liberica* Bull ex Hiern: A review. Indian Coffee. 44 (2-2): 29-36. 1980.

2. ALVARADO, G.; Y CORTINA, H. Comportamiento agronómico de progenies de híbridos triploides de *Coffea arabica* var. Caturra X (Caturra X *Coffea canephora*). Cenicafé. 48 (2): 73-91. 1997.
3. ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G. LASHERMES, P. The origin of the cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics. 104: 894-900. 2002.
4. ARCILA J.; FARFÁN F.; MORENO A. M.; SALAZAR L.; HINCAPIÉ E. Sistemas de producción de café en Colombia. Chinchiná: Cenicafé, 2007. 309 p.
5. BERNATSKY R.; TANKSLEY, S. Toward saturated linkage map in tomato based on isoenzymes and random cDNA sequences. Genetics. 112: 887-898. 1986.
6. BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Capítulo 1. Genetic resources of *Coffea*. P. 1-42. En: CLARKE, R.; MACRAE, R., Eds. Coffee: Agronomy. London: Elsevier Applied Science, 1988.
7. BERTHAUD, J. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploides: évaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs: Conséquences pour l'application. ORSTOM, 1986. 372 p. (Travaux de Documents de l'ORSTOM no. 188).
8. BOUHARMONT, J. Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. Bruxelles: INEA, 1959. 94 p. (Série scientifique n° 77).
9. CAMAYO G. C.; ARCILA J. Estudio anatómico y morfológico de la diferenciación y desarrollo de las flores del cafeto *Coffea arabica* L. variedad Colombia. Cenicafé. 47(3):121-139. 1996.
10. CAPOT, J. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire: les hybrides "Arabusta". Cafe Cacao Thé. 16(1):3-18. 1972.
11. CARVALHO A.; MONACO L. C. Genetic relationships of selected *Coffea* species. Ciencia e Cultura. 19(1):151-165. 1966.
12. ----- The breeding of arabica coffee. Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Wageningen, Holanda: Agricultural University. 1969.

13. CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache (*Mascarocoffea*): Leur relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Paris: ORSTOM, 1978. 223 p. (ORSTOM Mémoire N° 87).
14. CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. *Café Cacao Thé*. 19: 251-264. 1975.
15. -----. Capítulo 2. Botanical classification of coffee. P. 13-47. En: CLIFFORD, M.; WILLSON, K., Eds. *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*. Londres: Croom Helm, 1985.
16. CLARINDO W.R.; CARVALHO C.R. First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant. Syst. Evol.* 274:237-241. 2008.
17. COMBES, M.; ANDRZEJEWSKI, S.; ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; ROVELLI, P.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*. 9: 1171-1193. 2000.
18. CORTINA, H. El banco de germoplasma de café de Cenicafé. Resumen de conferencia. Chinchiná, Colombia: Cenicafé, 2002. p. 1.
19. D'ORNANO, M.; CHASSEVENT, F.; POUGNEAUD, S. Composition et caractéristique chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. I. Recherches préliminaires sur le tener en caféine et isolement de la cafamarine. P. 131-144. En: II Colloque Scientifique International sur la Chimie du Café. Paris, Francia: ASIC, 1965.
20. GRASSIAS, M.; KAMMACHER, P. Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*. 19(3): 177-190. 1975.
21. HERRERA, J.; COMBES, M.; CORTINA, H.; LASHERMES, P. Factors influencing gene introgression into the allotetraploid *Coffea arabica* L. from its diploid relatives. *Genome*. 47(6): 1053-1060. 2004.
22. HERRERA, J.; COMBES, M.; CORTINA, H.; ALVARADO, G. Y LASHERMES, P. Gene introgression into *Coffea arabica* by way of triploid hybrids *C. arabica* x *C. canephora*. *Heredity*. 89: 488-494. 2002.
23. KAMMACHER, P.; CAPOT, J. Sur les relations caryologiques entre *Coffea arabica* et *Coffea canephora*. *Café Cacao Thé*. 9(4): 3-19. 1968.
24. KRUG C.A.; CARVALHO A. The genetics of *Coffea*. *Adv. Genet.* 4:127-158. 1951.
25. LASHERMES, P.; COMBES, M.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics*. 261: 259-266. 1999.
26. LE PIERRÈS, D. Etude des hybrides interspécifiques tétraploïdes de première génération entre *Coffea arabica* L. et les caféiers diploïdes. Paris: University of Paris. 1995. Trabajo de grado: Ph.D.
27. LÓPEZ, G.; MONCADA, M. Construcción de un mapa de ligamiento genético preliminar en *Coffea liberica* x *C. eugenioides*. *Cenicafé*. 56(4): 319-338. 2005.
28. LOUARN, J. Hibridos interespecificos entre *Coffea canephora* Pierre et *C. eugenioides* Moore. *Café Cacao Thé*. 20(1): 33-52. 1976.
29. -----. Structure génétique des caféiers africains diploïdes basée sur la fertilité des hybrides interspécifiques. P. 243-252. En: Colloque Scientifique International sur le Café (N° 15: Junio 6-11, 1993: Montpellier, Francia). Paris, Francia: ASIC, 1993.
30. MAZZAFERA P.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.; MEDINA, H. Caffeine content seed of coffee under selection at instituto Agronômico de Campinas. En: Congresso de Sociedade Botânica de Sao Paulo. Sao Paulo: SBSP, 1990. 126 p. Resumos.
31. MAZZAFERA, P.; CROZIER, A.; MAGALHAES, A.C. Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. *Phytochemistry*. 30:3913-3916. 1991.
32. MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea* L.) by interspecific hybridization. *Euphytica*. 59: 55-60. 1992.
33. MEDINA, M. Observacoes citológicas em *Coffea*: XIV Microsporogenese en *Coffea arabica* L. var. *Rugosa* K. M. C. *Bragantia*. 10(2):61-66. 1950.
34. MENDES, A. Observacoes citológicas em *Coffea*. XV Microsporogenese en *Coffea arabica* L. *Bragantia*. 10(3): 79-87. 1950.
35. MEYER, F. Notes on wild coffee arabica from southwestern Ethiopia, with some historical considerations. *Economy Botany*. 19(2): 136-151. 1965.

36. MORENO, G.; CASTILLO, J. La variedad Colombia una variedad de café con resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.). Chinchiná, Colombia: Cenicafé, 1984. 25 p. (Boletín técnico N° 9).
37. OROZCO, F. Utilización del híbrido triploide de *Coffea arabica* por *C. canephora* en cruzamientos interespecíficos. *Cenicafé*. 27(4):143-157. 1976.
38. -----. Descripción de especies y variedades de café. Chinchiná, Colombia: Cenicafé, 1986. 29p. (Boletín técnico N° 11).
39. -----. Utilización de los híbridos triploides en el mejoramiento genético del café. P. 485-495 En: Colloque Scientifique International sur le Café. (N° 13: Agosto 21-25, 1989: Paipa, Colombia. ASIC, 1989.
40. -----. La hibridación interespecífica en café y las posibilidades de los híbridos triploides. En: FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS Eds. 50 años de Cenicafé 1938-1988: Conferencias Conmemorativas. Manizales, Colombia: Cenicafé, 1990. 255 p.
41. PINTO-MAGLIO C. A. F. Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18(1): 37-44. 2006.
42. PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. *Caryologia* 51:19-35. 1998.
43. ROMERO, J. V.; CORTINA, H. Fecundidad y ciclo de vida de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en introducciones silvestres de café. *Cenicafé*. 55 (3): 221-231. 2004.
44. -----. Tablas de vida de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) sobre tres introducciones de café. *Revista Colombiana de Entomología*. 33(1): 10-16. 2007.
45. STRENGE, H. Wild coffee in Kaffa province of Ethiopia. *Tropical Agriculture*. 33(4): 297-301. 1956.
46. SYBENGA, J. Genética y citología del café. *Turrialba*. 10(3):82-137. 1960.
47. WAGNER M.; BETTENCOURT A. J. Inheritance of reaction to *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. on *Coffea arabica* L. 121-123. En: CENTRO DE INVESTIGACÕES DAS FERRUGENS DO CAFÉ. Progress report 1960/1965. Oeiras, Portugal: CIFIC 1965.
48. WELLMAN, F. Coffee: botany, cultivation and utilization. Londres, Inglaterra: Leonard Hill, 1961. 488 p.