

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y
ENSEÑANZA (CATIE)
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
ÁREA DE POSTGRADO

HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA Y EFECTO DE LA RADIACIÓN
GAMMA PARA LA INDUCCIÓN DE PARTENOGENESIS
EN *MUSA* SPP.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico de Postgrado
y Capacitación del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas
y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de
Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

Por

JOSE LUIS MORENO MARTINEZ

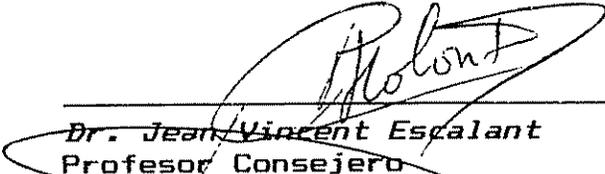
Turrialba, Costa Rica.

1993

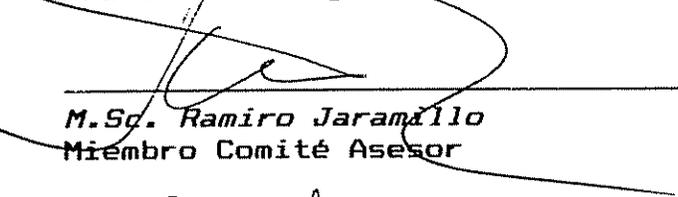
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

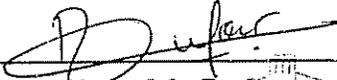
FIRMANTES:



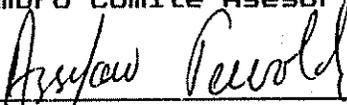
Dr. Jean Vincent Escalant
Profesor Consejero



M.Sc. Ramiro Jaramillo
Miembro Comité Asesor



Dra. Magali Dufour
Miembro Comité Asesor



Dr. Assefaw Tewolde
Miembro Comité Asesor



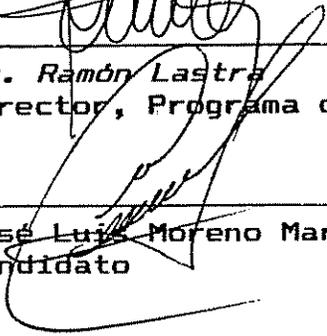
Dr. Benoit Bertrand
Miembro Comité Asesor



Dr. Assefaw Tewolde
Jefe, Area de Postgrado



Dr. Ramón Lastra
Director, Programa de Enseñanza



José Luis Moreno Martínez
Candidato

DEDICATORIA

A mi esposa: Carmen Ruíz Bello, por su constante apoyo y comprensión, para lograr mi superación.

A mis hijas: Paulina y Mariana

A mis padres: María Martínez Alvarez
José Luis Moreno Gómez

A mis hermanas: Martha, Bertha y Verónica

A mis suegros: Clemencia Bello Juárez
Alejandro Ruíz Reyes

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

- A la Universidad Autónoma de Chiapas por el apoyo financiero que me brindó, lo cual hizo posible mis estudios.
- Al Lic. Jorge Arias Zebadúa, Rector de la Universidad Autónoma de Chiapas; por haber aprobado mi solicitud y agilizar los trámites para estudiar este postgrado.
- Al Ing. Jorge Armando Soto Ponce, ex-director de la Escuela de Ciencias Agrícolas, por apoyar mis objetivos.
- A todos mis compañeros y amigos, especialmente al M.C. Juan Francisco Aguirre Medina y a su esposa Nieves Cadena.
- A los profesores miembros de mi comité asesor integrado por el Dr. Jean Vincent Escalant, M.Sc. Ramiro Jaramillo, Dra. Magali Dufour, M.Sc. Benoit Bertrand y Dr. Assefaw Tewolde.
- Al Dr. Jean Vincent Escalant y M. Sc. Ramiro Jaramillo, quienes financiaron mi capacitación en electroforesis por isoenzimas en Las Islas Guadalupe.
- Al Dr. Jean Pierre Horry, por transmitirme sus conocimientos en electroforesis de isoenzimas, aplicados en Musáceas.
- Al M.Sc. Hernán Camacho Vindas y al Biol. Bernal Camacho Zamora por todas las facilidades brindadas para dar los tratamientos de irradiación al polen.
- A la M.Sc. Nelly Vázquez Morera por su colaboración directa en las preparaciones y observaciones realizadas en el microscopio.
- Al personal de apoyo del laboratorio que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo. En especial al Sr. Rigoberto Núñez.
- Al Sr. Francisco Solano, por su amistad y apoyo decidido en los trabajos de fotografía.
- A todos mis compañeros del CATIE, especialmente a Alex Tineo Bermudéz por su amistad y gran dedicación académica para todos mis compañeros.

C O N T E N I D O

RESUMEN.....	vi
SUMMARY.....	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1 Clasificación taxonómica.....	6
2.2 Vías para obtención de haploides.....	8
2.2.1 Haplodización espontánea.....	9
2.2.1.1 Ginogénesis.....	9
2.2.1.2 Androgénesis.....	9
2.2.1.3 Semigámia.....	11
2.2.1.4 Poliembrionía.....	11
2.2.2 Haplodización inducida.....	11
2.3 Ciclo reproductivo y partenogénesis <i>in vitro</i>	12
2.4 Hibridación interespecífica.....	21
2.5 Efecto de las radiaciones en plantas.....	25
2.6 Uso de marcadores.....	36
2.6.1 Marcadores morfológicos.....	36
2.6.2 Isoenzimas como marcadores genéticos.....	37
3. MATERIALES Y METODOS.....	43
3.1 Material vegetal.....	43
3.2 Equipo y dosis de irradiación al polen.....	43
3.3 Cruzamientos interespecíficos.....	44
3.4 Muestreo de frutos.....	45
3.5 Identificación de semillas.....	47
3.6 Rescate de embriones.....	47
3.7 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....	48
3.8 Adaptación de plantas.....	48
3.9 Densidad estomática.....	48
3.10 Conteos cromosómicos.....	48
3.11 Electroforesis de isoenzimas.....	49
4. RESULTADOS.....	52
4.1 Conteo de semillas.....	52
4.1.1 Hibridación de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmanni-</i> <i>coides</i> por <i>Musa balbisiana</i> tipo Tani con diferen- tes dosis de irradiación al polen.....	52
4.1.2 Hibridación de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmanni-</i> <i>coides</i> por <i>Musa beccarii</i>	59

4.1.3 Hibridación de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> por <i>Musa ornata</i>	61
4.1.4 Hibridación de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> por <i>Musa balbisiana</i> tipo Tani con diferentes dosis de irradiación.....	64
4.1.5 Hibridación de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> con polen de las especies <i>Musa ornata</i> y <i>M. beccarii</i>	69
4.2 Cantidad de semillas por fruto.....	74
4.2.1 Frutos de <i>burmannicoides</i>	74
4.2.2 Frutos de <i>malaccensis</i>	76
4.3 Rescate de embriones.....	76
4.4 Germinación de los embriones cigóticos.....	78
4.4.1 Germinación <i>in vitro</i> de embriones de semillas de <i>burmannicoides</i>	80
4.4.2 Germinación <i>in vitro</i> de embriones de semillas de <i>malaccensis</i>	81
4.5 Densidad estomática.....	83
4.6 Conteos cromosómicos.....	84
4.7 Electroforesis de isoenzimas.....	85
4.7.1 <i>Musa acuminata burmannicoides</i> por <i>M. beccarii</i> ..	85
4.7.1.1 Peroxidasa.....	85
4.7.1.2 Malato deshidrogenasa.....	87
4.7.1.3 Isocitrato deshidrogenasa.....	88
4.7.2 <i>Musa acuminata burmannicoides</i> por <i>M. balbisiana</i> tipo Tani.....	88
4.7.2.1 Peroxidasa.....	88
4.7.2.2 Malato deshidrogenasa.....	90
4.7.2.3 Isocitrato deshidrogenasa.....	90
4.7.3 <i>Musa acuminata malaccensis</i> por <i>M. balbisiana</i> tipo Tani.....	91
4.7.3.1 Peroxidasa.....	91
4.7.3.2 Malato deshidrogenasa.....	91
4.7.3.3 Isocitrato deshidrogenasa.....	93
4.7.4 <i>Musa acuminata malaccensis</i> por <i>M. ornata</i>	93
4.7.4.1 Peroxidasa.....	93
4.7.4.2 Malato deshidrogenasa.....	95
4.7.4.3 Isocitrato deshidrogenasa.....	95
5. DISCUSION.....	96
5.1 Identificación de semillas	96
5.2 Cantidad de semillas por fruto.....	99
5.3 Rescate de embriones.....	100
5.4 Germinación de embriones cigóticos.....	101
5.5 Obtención de plantas.....	102
5.6 Densidad estomática	103

5.7	Conteos cromosómicos.....	103
5.8	Electroforesis de isoenzimas.....	104
6.	CONCLUSIONES.....	106
7.	RECOMENDACIONES.....	108
8.	BIBLIOGRAFIA.....	109
9.	ANEXOS.....	115

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Cruzamientos interespecíficos y dosis de irradiación al polen estudiados en <i>Musa</i> spp. CATIE. Turrialba, C.R...	47
2. Porcentaje de semillas obtenidas en <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> por hibridación con polen a diferentes dosis de irradiación de <i>M. balbisiana</i> tipo Tani.....	53
3. Porcentaje de semillas obtenidas de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> por hibridación con polen irradiado de <i>M. beccarii</i>	60
4. Porcentaje de semillas obtenidas por hibridación entre <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> con polen irradiado de <i>M. ornata</i>	63
5. Porcentaje de semillas obtenidas en <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> por hibridación con <i>M. balbisiana</i> tipo Tani en diferentes tratamientos de irradiación al polen.....	66
6. Porcentaje de semillas obtenidas por hibridación de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> con polen de especies ornamentales.....	71
7. Cantidad promedio de semillas por fruto en <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i>	75
8. Cantidad promedio de semillas por fruto de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i>	77
9. Rescate y germinación de embriones de los cruzamientos interespecíficos en <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> ..	79
10. Rescate y germinación de embriones de los cruzamientos interespecíficos en <i>malaccensis</i>	82
11. Densidad estomática promedio de las plantas obtenidas de los cruces interespecíficos.....	83
12. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de <i>burmannicoides</i> por <i>beccarii</i>	86
13. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de <i>burmannicoides</i> por Tani.....	89
14. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de <i>malaccensis</i> por <i>balbisiana</i> tipo Tani.....	92
15. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de <i>malaccensis</i> por <i>ornata</i>	94

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diferentes vías de haploidización espontánea e inducida (Zhang, 1988).....	10
2. Ciclo de vida de una angiosperma (Flores, 1989).....	14
3. Procesos de reproducción en plantas (Poehlman, 1983)....	16
4. Representación esquemática de una semilla y de un embrión de <i>Musa</i> (MacGaham, 1961).....	20
5. Porcentaje de semillas tipo I y II de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> obtenidas por polinización con polen de <i>Musa balbisiana</i> tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.....	55
6. Porcentaje de semillas tipo III y IV de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>burmannicoides</i> obtenidas por polinización con polen de <i>Musa balbisiana</i> tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.....	58
7. Porcentaje de semillas de <i>Musa acuminata burmannicoides</i> obtenidas por polinización con polen de <i>Musa beccarii</i> en diferentes dosis de irradiación.....	62
8. Porcentaje de semillas de <i>Musa acuminata burmanicoides</i> obtenidas por polinización con polen de <i>Musa ornata</i> , irradiado a diferentes dosis.....	65
9. Porcentaje de semillas tipo I y II de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> obtenidas por polinización con polen de <i>Musa balbisiana</i> tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.....	68
10. Porcentaje de semillas tipo III y IV de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> obtenidas por polinización con polen de <i>Musa balbisiana</i> tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.....	70
11. Porcentaje de semillas obtenidas de <i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> polinizadas con polen de <i>Musa ornata</i> y <i>Musa beccarii</i>	73

MORENO MARTINEZ, J.L. 1993. Hibridación interespecífica y efecto de la radiación gamma para la inducción de partenogénesis en *Musa* spp. Tesis M. Sci. CATIE. Turrialba, C.R.

Palabras claves: *Musa*, Hibridación interespecífica, radiación gamma, polen irradiado, partenogénesis, electroforesis, isoenzimas.

R E S U M E N

Se efectuaron cruzamientos interespecíficos en *Musa* con el objetivo de obtener haploides mediante la inducción de partenogénesis con polen irradiado con rayos gamma (^{60}Co). Se utilizaron como hembras dos subespecies de *Musa acuminata*: *burmannicoides* clón Calcuta 4 (Bur) y *malaccensis* (Ma). Las polinizaciones se hicieron con polen de *M. balbisiana* tipo Tani (60-300 Gy) y de las especies ornamentales: *M. ornata* (120-220 Gy) y *M. beccarii* (70-170 Gy).

Se cuantificó el total de semillas de un mínimo de tres frutos por tratamiento. Las semillas se identificaron en cuatro tipos. Los embriones cigóticos se rescataron a los 90 y 120 días, de semillas tipo I (normales) y tipo II (anormales). El medio de cultivo fué Murashige y Skoog (1962), modificado por Escalant y Teisson (1987).

Las dosis de irradiación que producen más semillas anormales fueron: 70 Gy en Bur y de 60 y 120 Gy en Ma.

Los cruces interespecíficos con la subespecie *malaccensis* indican una mayor fertilidad de las semillas con relación a la dosis de irradiación al polen.

En la germinación de los embriones obtenidos por cruces con polen irradiado por lo general no observó callogénesis-embriogénesis. A mayores dosis los embriones presentan menor crecimiento, latencia y/o muerte después de la germinación. La germinación es crítica para obtener plantas por polinización con polen irradiado, por lo que se recomienda evaluar diversos medios de cultivo.

La técnica de electroforesis de isoenzimas se aplicó a las plantas obtenidas por polinización con polen sin irradiación en los cruces: *burmannicoides* x *beccarii*, *burmannicoides* x Tani, *malaccensis* x *ornata* y *malaccensis* x Tani. Con el sistema MDH se distinguen mejor los genotipos estudiados. Todas las plantas obtenidas por cruzamientos sin irradiación son híbridos por lo que no se induce la partenogénesis. Sin embargo; falta confirmar esta metodología en las plantas polinizadas con polen irradiado, motivo de una publicación posterior.

MORENO MARTINEZ, J.L. 1993. Interspecific hybridization and effect of gamma radiation for parthenogenesis induction in *Musa* spp. Thesis M. Sci. CATIE. Turrialba, C.R.

Key words: *Musa*, interspecific hybridization, gamma radiation, irradiated pollen, parthenogenesis, electrophoresis, isozymes.

SUMMARY

Musa interspecific crosses were achieved in order to obtain haploids through parthenogenesis induction with gamma (^{60}Co) irradiated pollen. Two *Musa acuminata* subspecies were utilized as females: *burmannicoides* Calcuta 4 (Bur) and *malaccensis* (Ma). Polinizations were made with *M. balbisiana* type Tani pollen (60-300 Gy) and with the ornamental species *M. ornata* (120-220 Gy) and *M. beccarii* (70-170 Gy).

The total seeds of a minimum of three fruits per treatment were quantified. Seeds were divided into four types. Zygotic embryos of type I (normal) and type II (abnormal) seeds were rescued after 90 and 120 days. The culture medium utilized was Murashige and Skoog (1962), modified by Escalant and Teisson (1987).

The irradiation doses which produced more abnormal seeds were: 70 Gy for Bur and 60 and 120 Gy for Ma.

The *malaccensis* subspecies interspecific crosses indicate a higher seeds fertility related to the irradiation dose applied to pollen.

No callogenesis-embryogenesis was observed on germination of embryos obtained through pollen irradiated crosses. At higher doses embryos showed less growth, latency and/or death after germination. Germination is critical in order to obtain plants by irradiated pollen polinization, for which it is recommended to evaluate several culture mediums.

The isozymes electrophoresis technique was applied to plants obtained through polinization with non irradiated pollen of the crosses: *burmannicoides* x *beccarii*, *burmannicoides* x Tani, *malaccensis* x *ornata* and *malaccensis* x Tani. The utilization of the MDH system allowed to better distinguish the genotypes under study. All plants obtained by non irradiation crosses were hybrids for which no parthenogenesis was induced. Nevertheless, it still remains to assess the present methodology on plants polinated with irradiated pollen, but it will be the subject of a future publication.

1. INTRODUCCION

Los bananos cultivados fueron clasificados por Simmonds (1962), dentro de la sección *Eumusa* y del género *Musa* perteneciente al orden de las Zingiberales.

El género *Musa* comprende muchas especies seminíferas y una cantidad importante de variedades con frutos partenocárpicos; es decir, frutos con mucha pulpa y sin semillas.

Los plátanos y bananos son originarios del sureste de Asia y se propagan vegetativamente. Su organización genética está basada en dos especies diploides; *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, con los genomas A y B, respectivamente. Genotipos silvestres rudimentarios y usualmente no partenocárpicos todavía se encuentran en estas dos especies (Lanaud *et al.*, 1992). Los más ampliamente cultivados son triploides y poseén un alto grado de esterilidad (Borges, 1977) con los grupos genómicos AAA, AAB y ABB (Escalant y Teisson, 1989).

El consumo de los bananos es como fruta en tanto que los plátanos al contener más almidón comúnmente se consumen cocinados.

El germoplasma de musáceas que está directamente disponible, es actualmente un conjunto aproximado de 1000 clones. Este número es muy bajo al compararse con los miles de variedades en muchos cultivos reproducidos por semillas (De Langhe, 1987).

De acuerdo con Ganry (1990), la obtención de una mayor variabilidad genética da la alternativa para diversificar la producción bananera, para así lograr un mejor control de plagas, que a nivel internacional es el principal problema que afrontan las regiones productoras de banano y plátano.

Shepherd (1986), considera que el germoplasma, existe en tres niveles cromosómicos y las posibilidades de mejoramiento son por hibridación ó por búsqueda de mutaciones. Las opciones de hibridación son: generación de triploides a partir de diploides, generación de tetraploides a partir de triploides e hibridación entre tetraploides y diploides.

El mejoramiento actual en musáceas tiende a la obtención de líneas homocigotas, que puede ser mediante autofecundaciones en un lapso de ocho a diez años. Con apoyo de la biotecnología ese tiempo se puede reducir al manipular los factores biológicos del ciclo reproductivo. Las técnicas alternas para la producción de haploides, tales como el cultivo de anteras (androgénesis), el cultivo de óvulos (ginogénesis) y la partenogénesis inducida

(ginogénesis inducida) son de interés para los fitomejoradores (Pandey *et al.*, 1990).

La partenogénesis inducida con polen irradiado, puede constituir una alternativa para obtener haploides y alcanzar la homocigosis en menor tiempo. La partenogénesis es el desarrollo de un individuo a partir de un gameto sin fertilizar. Dicho desarrollo puede ser estimulado por efectos hormonales, químicos o físicos, que alteren la fertilización y conduzcan al desarrollo y transformación de la célula huevo en condición haploide (un solo lote de cromosomas). El resultado de la alteración produce diferencias en la formación del embrión y el endospermo en las semillas. En condiciones naturales solo las semillas normales (con embrión y con endospermo), son capaces de germinar y producir una planta. Sin embargo, también se pueden formar semillas anormales, las cuales son eliminadas por selección natural limitando la variabilidad y deben ser motivo de estudio para obtener nuevas plantas.

Con la técnica de electroforesis, se estudia el polimorfismo enzimático, que tiene gran importancia en el fitomejoramiento, puesto que permite identificar la variabilidad de una progenie en etapas tempranas de su desarrollo, sin necesidad de esperar la manifestación fenotípica hasta la etapa reproductiva.

El estudio de zimogramas puede realizarse a través de una lectura fenotípica (considerando la ausencia ó presencia de bandas a una determinada posición) y puede darnos idea entre las posibilidades de una interpretación genotípica; dicha interpretación permite distinguir a los genotipos heterocigotos y homocigotos, además de apreciar la diversidad en términos de genética de poblaciones (Horry, 1989).

Con el objeto de contribuir con los programas de mejoramiento en musáceas, el presente trabajo de investigación propone desarrollar una metodología para obtener haploides, por inducción de partenogénesis mediante el rescate y cultivo *in vitro* de embriones cigóticos provenientes de semillas con y sin endospermo. Para esto se hicieron cruzamientos interespecíficos utilizando polen irradiado con rayos Gamma a diferentes dosis.

Los objetivos que se plantean en este trabajo se enumeran a continuación:

- 1) Determinar la dosis de radiación de polen en *Musa balbisiana* tipo Tani (BB) para obtener la máxima cantidad de semillas con embrión y sin endospermo (mayor posibilidad de ser haploides).

- 2). Determinar la factibilidad de uso de polen de las especies ornamentales *Musa beccarii* y *Musa ornata* para estimular la partenogénesis.

- 3). Regenerar plantas a partir de embriones obtenidos con los diferentes tratamientos de polinización.

- 4). Determinar el grado de homocigosis en las plantas obtenidas.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Clasificación taxonómica

La planta de banano al igual que la de plátano pertenece a la clase monocotiledoneas, que por poseer sépalos coloreados y ovario adherente ínfero, se han situado dentro del orden de las Zingiberales. Dentro de este orden se encuentra la familia Musaceae, que a su vez está dividida en tres subfamilias Strelitzoideae, Heliconoideae y Musoideae. A ésta última pertenecen los géneros *Musa* y *Ensete*.

El lugar de origen del género *Musa*, está situado aparentemente, en la zona intertropical, entre la India y el Pacífico; en esta región todavía se encuentra la mayor diversidad (Horry, 1989). Dentro del género *Musa* están consideradas las secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa* (Belalcázar, 1991).

La sección *Australimusa* está formada por cinco o seis especies con un número cromosómico haploide $n=10$ de los cuales solo *Musa textilis* NEE tiene importancia económica en la extracción de fibra y, por lo menos, una especie se consume cocida en algunas Islas del Pacífico (Champion, 1968).

La sección *Callimusa* comprende de seis a diez especies con interés botánico. El número cromosómico base es igual a 10.

La sección *Rhodochlamys* comprende de cinco a siete especies caracterizadas por una inflorescencia vertical y colores vivos; estas especies son apreciadas comunmente como ornamentales. El representante más típico es *Musa ornata* ROXB que posee un número de cromosomas básico igual a 11.

La sección *Eumusa*, es la de mayor interés, pues está actualmente aprobado que solo son dos especies. *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) en cruzamiento interespecífico han originado la mayoría de los cultivares comestibles. En la clasificación de los bananos comestibles no se usan los nombres científicos; puesto que, según Simmonds (1973), estos nombres se han prestado más para confundir que para aclarar, por lo que se debe mencionar el grupo genómico al cual pertenecen; ya sean estos AA, AAA, AAAA, AB, AAB, ABB o bien ABBB (Soto, 1990).

Los cultivares AA son numerosos solamente en Asia, aunque el denominado "Ouro" en Brasil, presenta una amplia diseminación en regiones tropicales. Los AB son principalmente conocidos en India. Los cultivares triploides son mejores que los diploides en términos de vigor, productividad y aceptación, presentando frutos mayores, con pulpa madura menos densa, incluyen todos los bananos cultivados en el mundo a gran escala.

Los cultivares tetraploides son relativamente raros y poco cultivados en todo el mundo. Sin embargo, pueden producirse mediante polinizaciones controladas de determinados cultivares triploides (Shepherd, 1986).

La primera especie en particular que no poseeseudotrongo es *Musa beccarii* y presenta ciertas afinidades con la sección *Callimusa*, pero difiere en el número básico de cromosomas que es de 9. *Musa ingens* es la hierba común más grande del mundo (seudotrongo de 10 a 15 metros de altura). Esta especie tiene un número cromosómico base igual a 7, formando ellos así, la sección *Ingentimusa* creada por Argent, (1976); citado por Horry (1989).

2.2 Vías para obtención de haploides

En el trabajo realizado por Zhang (1988), se mencionan las diferentes vías de haploidización en las plantas superiores.

Son haploides las células y las plantas que poseen el número gamético de cromosomas de la especie.

En las plantas superiores la obtención de haploides (haploidización) puede ser producida espontáneamente o inducida por varios métodos (ver figura 1).

2.2.1 Haploidización espontánea

La primera planta haploide espontánea fué descubierta en *Datura stramonium*, por Blakeslee y colaboradores en 1922. Desde entonces se han encontrado en muchas especies. Hay cuatro mecanismos que pueden explicar este fenómeno: ginogenesis, androgenesis, semigamia y poliembrionía, que se describen brevemente a continuación.

2.2.1.1 Ginogénesis

El individuo se origina por el desarrollo de un solo núcleo del gametofito femenino no fecundado. Con la hipótesis del desarrollo partenogenético de la oosfera, se nota en la aparición de individuos ginogenéticos espontáneos con frecuencia de 10^{-3} .

2.2.1.2 Androgénesis

Después de la polinización, el individuo haploide vá a originarse del desarrollo de un núcleo del gameto masculino dentro del citoplasma femenino. La androgenesis espontánea es un fenómeno generalmente raro con relación a la ginogenesis espontánea.

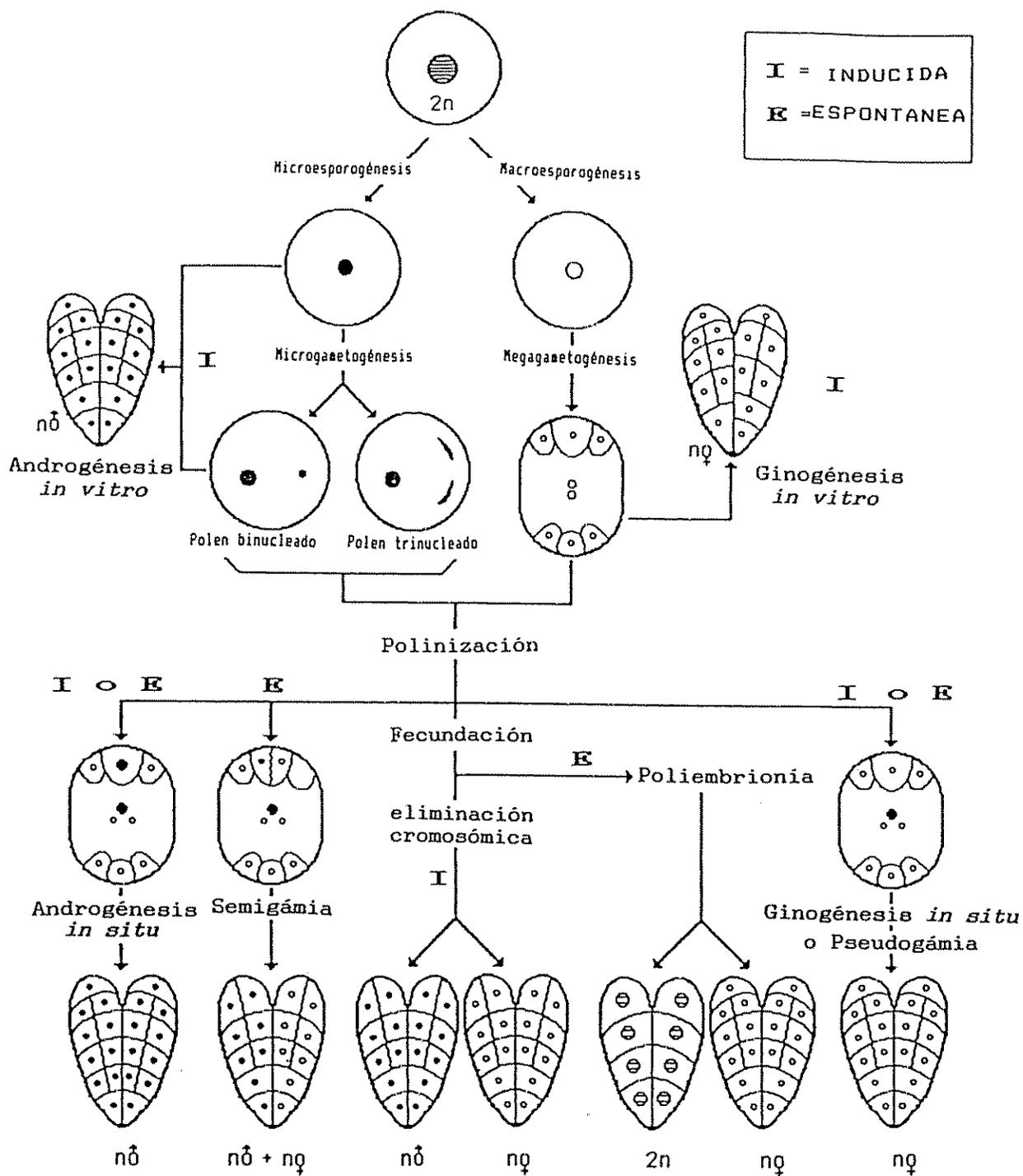


Figura 1. Diferentes vías de haploidización espontánea e inducida (Zhang, 1988).

2.2.1.3 Semigamia

Cada fenómeno se caracteriza por una fecundación anormal y una penetración de los núcleos masculinos, pero no se fusionan con el núcleo femenino, más el cariotipo no se produce. Los núcleos masculinos y femeninos se dividen simultáneamente y se obtiene un mosaico de embriones de sectores haploides de origen paterno y materno.

2.2.1.4 Poliembrionía

Un individuo haploide a veces es obtenido a partir de los embriones gemelos o triples de una sola semilla. La hipótesis con mayor consistencia, formula el origen celular de un embrión haploide, dentro de una semilla poliembrionica, es el desarrollo apogámico de la sinérgida restante intacta después de entrar el tubo polínico dentro del saco embrionario. Recientemente varios autores mostraron que la poliembrionía haploide-diploide es atribuida a la división, antes de la fecundación, de la oosfera inicial en dos oosferas equipotentes de las cuales una puede desarrollar partenogenéticamente y la otra es fecundada.

2.2.2 Haploidización Inducida

Las principales formas en que se puede inducir haploides son:

a). Por alteración del desarrollo gametofítico y esporofítico mediante cultivo *in vitro* (androgénesis o ginogénesis *in vitro*).

b). Por inhibición de la doble fecundación con tratamientos físicos o químicos de los gametofitos machos o hembras sobrevivientes de una polinización (pseudogamia y androgénesis *in situ*).

c). Por eliminación del contenido cromosómico parental durante la embriogénesis por cruzamientos interespecíficos.

Tomando en cuenta las diferentes formas de inducción de haploides, es necesario revisar algunos temas para interpretar mejor los resultados de este trabajo de tesis.

2.3 Ciclo reproductivo y partenogénesis *in vitro*

En angiospermas, el desarrollo de las semillas varía extensivamente en diferentes grupos de plantas, pero el proceso principal invariablemente consiste de los tres eventos siguientes: 1) doble fertilización, 2) iniciación de división meiótica del huevo fertilizado y núcleo espermático primario asociado con un incremento de endospermo citoplásmico y 3) diferenciación del embrión y endospermo seguido por cambios estructurales y

fisiológicos del promedio de tejidos que forman el óvulo (Nishiyama y Yabuno, 1978).

Durante la floración, la planta o esporofito produce microesporas que forman microgametofitos y megasporas que desarrollan megagametofitos. Ambos gametofitos están reducidos a a proporciones microscópicas. El microgametofito es liberado como un grano de polen; el megagametofito o saco embrionario es retenido en el esporofito como parte del rudimento seminal. Si el polen se deposita sobre la superficie estigmática receptiva de una flor compatible germina y uno de sus espermias fertiliza a la célula huevo u oosfera y el saco embrional. Así se origina el cigoto y se forma la semilla a partir del rudimento seminal (Ver figura 2) y el otro núcleo espermático se une con los dos núcleos polares, el cual usualmente se fusiona al núcleo central. El resultado es una célula triploide que constituye el endospermo (Asker, 1979).

En la mayoría de las angiospermas, el saco embrionario consta de siete células: célula huevo, dos sinérgidas y una célula central (con dos núcleos) y tres antípodas. La célula huevo y las sinérgidas son grandes, alargadas y se encuentran en el extremo micropilar del saco embrionario.

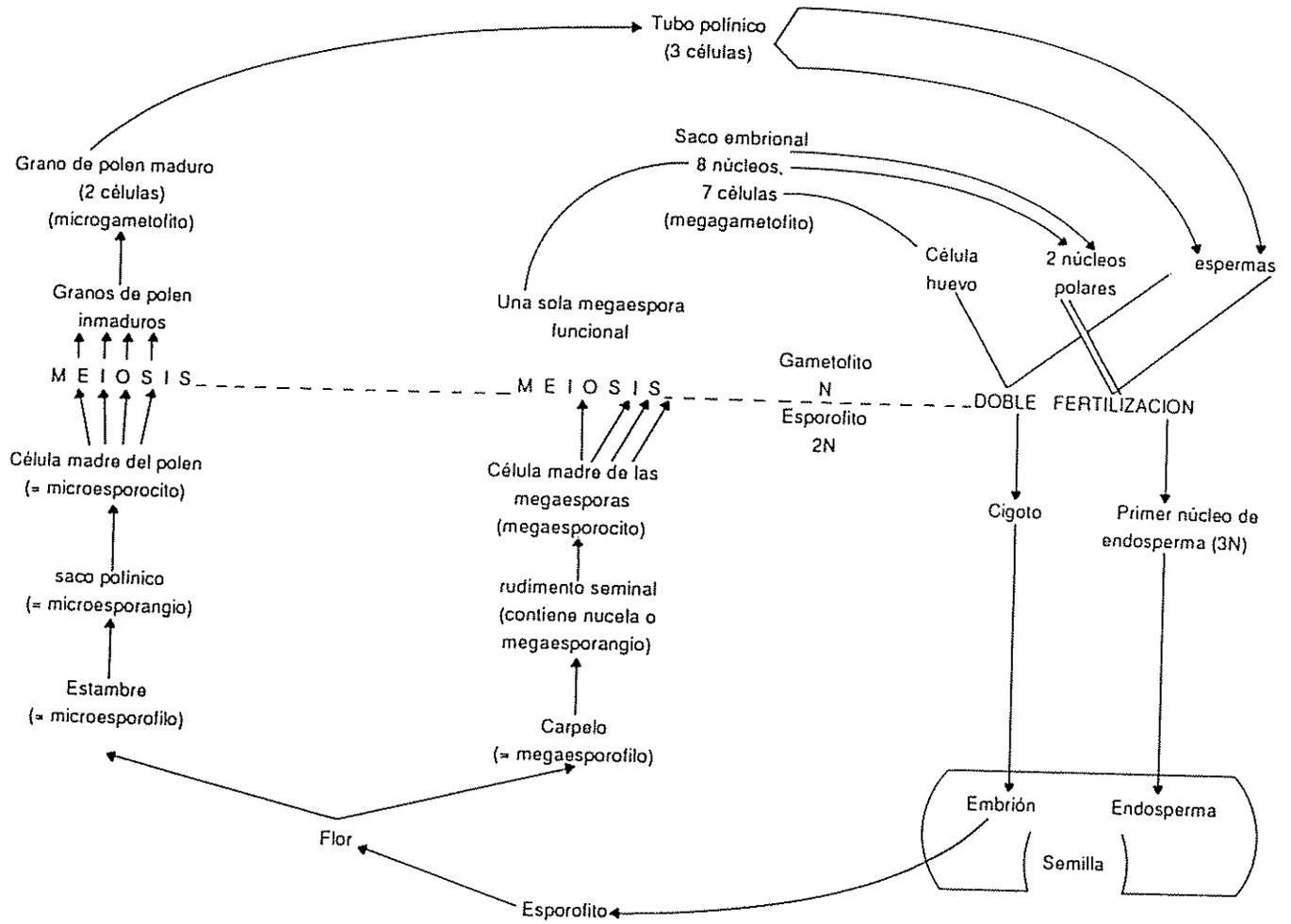


Figura 2. Ciclo de vida de una angiosperma (Flores, 1989).

Estas células tienen una distribución determinada, comparten superficies comunes y forman una estructura que recibe el nombre de "Aparato del huevo", el cual está unido a la pared del saco embrionario solo en el extremo micropilar; por lo general únicamente las sinérgidas están en contacto con el micrópilo. La célula central ocupa la mayor porción del saco embrionario (Flores, 1989).

Por lo anterior, es razonable asumir que generalmente en los óvulos donde se presenta la doble fertilización se desarrolle una semilla diploide viable, para obtener una planta $2n$ (ver la figura 3). Sin embargo, también pueden detectarse algunas anomalías en este proceso, que son motivo de análisis.

El desarrollo de un embrión de un núcleo o célula sin fertilizar, como resultado de la estimulación o usando polen de otras especies, es llamado apomixis pseudogámica. Cuando un embrión haploide o diploide se desarrolló de una célula huevo sin fertilizar, esto es llamado partenogénesis haploide o diploide respectivamente, pero ésta última no es de interés para los fitomejoradores por su naturaleza heterocigota (Eenink, 1974).

Las semillas haploides se derivan de células huevo haploides inducidas y las semillas diploides pueden derivarse de huevos diploides raros producidos mediante meiosis anormal (partenogénesis diploide) o de huevos haploides normales estimulados a duplicar su

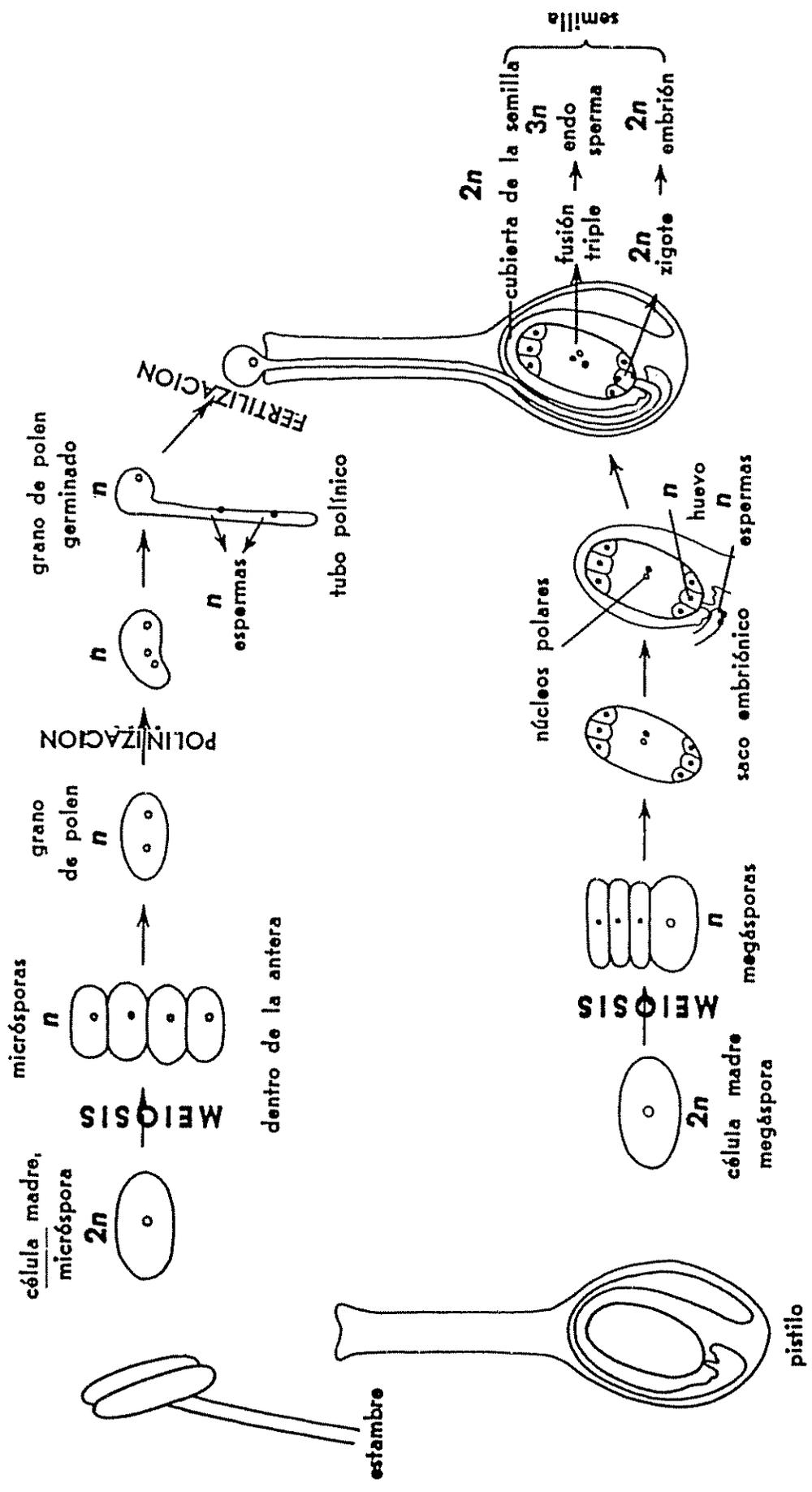


Figura 3. Procesos de reproducción en plantas (Poehlman, 1983).

número cromosómico produciendo embriones diploides (diploidía partenogenética). Esta última posibilidad es particularmente interesante para el fitomejorador ya que directamente daría origen a diploides fértiles homocigotos (Pandey *et al.*, 1990).

Es posible que la polispermia (cuando más de un tubo polínico entra en el mismo óvulo) esté involucrada en el fenómeno de diploidía partenogenética en plantas sexuales. Un tubo polínico puede enviar "residuos" genéticos que pueden estimular la célula huevo al desarrollo partenogenético, y el otro tubo de polen puede estimular el núcleo central a formar endospermos. El núcleo central debe ser fertilizado para asegurar la formación del endospermo y la semilla (Asker, 1980; Pandey *et al.*, 1990).

El desarrollo partenogenético de células huevo tiene lugar ocasionalmente en plantas sexuales, mientras que en plantas con apomixis gametofítica regular, es una necesidad. La tendencia latente hacia la partenogénesis en plantas sexuales es a producir haploides (Asker, 1980; Pandey *et al.*, 1990).

Se conocen alteraciones en apomixis y sexualidad en pastos y en potentilla, en los ciclos diploide-tetraploide-haploide (o diploide), por lo que se considera que el modo de reproducción está influenciado por el polinizador (partenogénesis inducida en

sexuales) y los factores ambientales, así como por el nivel de ploidía (Asker, 1979).

Cronauer y Krikorian (1988) obtuvieron embriones somáticos de una semilla diploide de banana ornamental (*Musa ornata* Roxb) de cultivo de embriones cigóticos sobre medio Murashige y Skoog (1962) con la auxina 2,4-D (0.5, 1 y 2 mg.l⁻¹) y 5% CW. Se removieron de 2,4-D y fueron transferidos al medio de Shenk y Hildebrandt (1972) con sales CW seguidos por medio MS para conducir los embriones a germinación y desarrollo. La germinación de los embriones cigóticos inició con la emergencia de la raíz primaria, pero esto es estimado pronto por el gran número de raíces adventicias. Subsecuentemente la plúmula emerge y tal como el desarrollo radicular, las primeras dos hojas son vainas menos angostas y la primer expansión de la hoja bandera se forma sobre la tercer hoja.

Por otra parte, Escalant y Teisson (1987) reportaron la obtención rápida de clones de *Musa* a partir de embriones aislados sobre medio enriquecido con diversas auxinas y citocininas. La adición de 6-bencilaminopurina y de ácido endol-3-acético permitió la formación de numerosos brotes a la base de la yema. El desarrollo de los brotes fué obtenido por transferencia a un medio con escaso contenido de citocinina.

La adición suplementaria de sulfato de adenina permitió la formación de un gran número de meristemas después del desarrollo de una protuberancia de la estructura del tejido ("neotejido").

En 1989, estos mismos autores reportan que en previas investigaciones se han obtenido embriogénesis atípicas en bananos y plátanos con suspensión de embriones o bien desarrollando el embrión dentro de las plantas. En bananos existe mayor interés en la investigación sobre embriogénesis somática, usando tejidos extremadamente jóvenes de embriones cigóticos en especies diploides. Concluyen que los embriones cigóticos que resultaron de semillas de menos de 60 días de edad produjeron un callo pequeño (125 mm^3) con un desarrollo lento. Los callos más frecuentes aparecieron en semillas de 45 días de edad (32%) en comparación con los de 25 días (16%) pero en todos los casos, los callos de color blanco produjeron numerosos embriones somáticos.

En trigo de invierno Sidorova et al.(1990), reportan la aplicación de irradiación con rayos gamma en dosis de 4 Gy a los 14 días después de la antesis en los genotipos estudiados. La variación fue en altura, ciclo vegetativo y forma de la espiga.

En la figura 4, se muestran las partes de la semilla de *Musa balbisiana*, reportado por McGaham (1961), se ve el embrión y endospermo, con más interés en los objetivos de este trabajo.

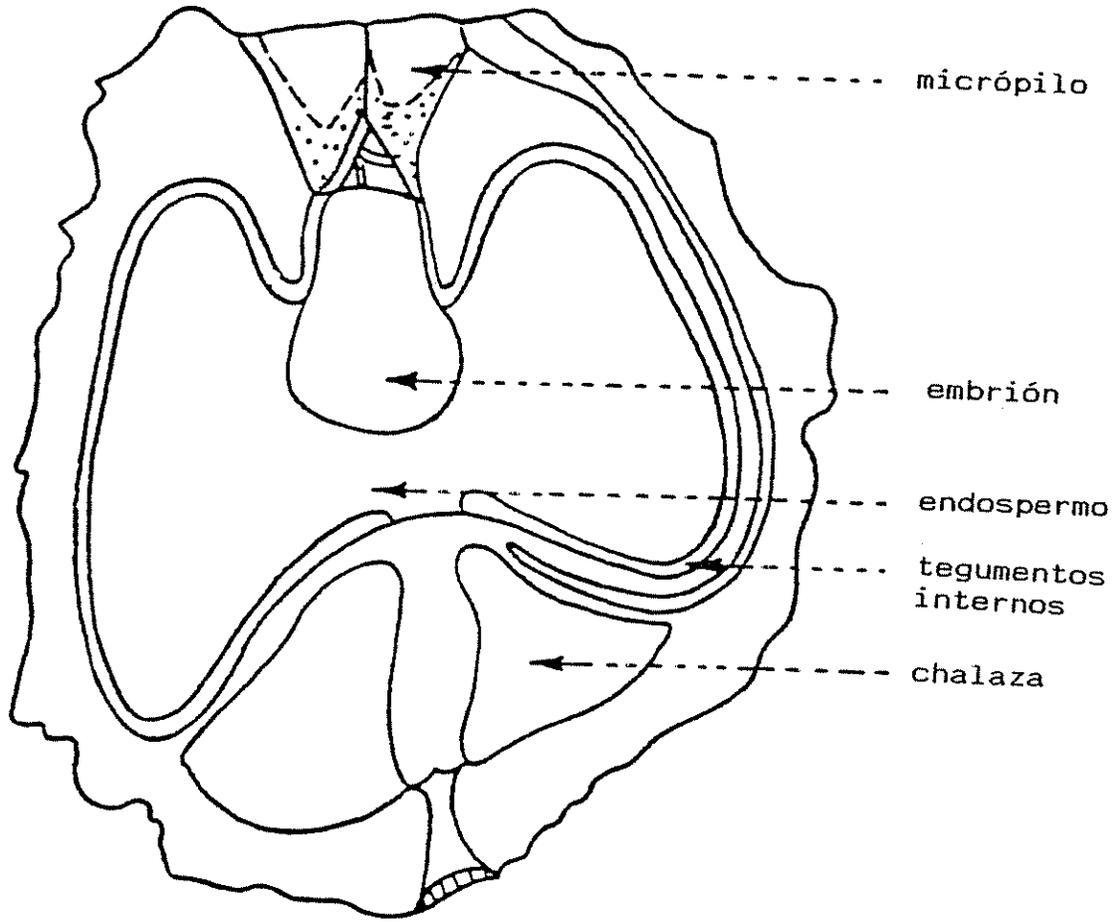


Figura 4. Representación esquemática de una semilla y de un embrión de *Musa* (MacGaham, 1961).

El reciente estudio de Hang y Bregitzer (1993) informan que las aberraciones cromosómicas que se presentan durante el cultivo *in vitro* de cebada (*Hordeum vulgare* L.), pueden afectar la regeneración de plantas. Este estudio examinó como afecta la frecuencia de regeneración de plantas de callos derivados de embriones inmaduros por genotipo, duración de cultivo y la frecuencia de aberraciones cromosómicas en callos celulares.

Se observaron aberraciones (en cultivos tetraploides $2n=28$) y células aneuploides. Con la duración del cultivo, la regeneración de plantas decreció y se incrementaron las aberraciones cromosómicas, pero la estabilidad citogenética relativa no se relacionó con la habilidad de regeneración de plantas.

2.4 Hibridación interespecífica

Según Simmonds (1962), los plátanos y bananos cultivados son generalmente originados por hibridación interespecífica de las especies diploides fértiles *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. Las dos especies son simpátricas en una gran zona geográfica, de Birmania a Nueva Guinea en el SE de Asia, y semejantes cruzamientos debieron haber sido bastante frecuentes.

Los padres fueron aislados reproductivamente, sin embargo, esto no es razón para creer que ocurrió introgresión. La cruza ha

tenido mucha importancia para contribuir a la variabilidad de los bananos comestibles.

Simmonds (1962) reportó el análisis de varios cruzamientos, dentro de los genotipos de *Eumusa*, dentro de *Rhodochlamys* y entre *Eumusa* y *Rhodochlamys*, observó que con las cruzas *acuminata* x *ornata* se obtiene un 49.7% de fertilidad y de la progenie resultante se obtuvieron ocho individuos diploides, cuatro son triploides y 135 pentaploides. En la cruzada *balbisiana* x *ornata* la fertilidad tiende a cero. Para los cruzamientos de *acuminata* x *laterita* y *balbisiana* x *laterita*, la fertilidad fué de 38.2 y 24.0%, respectivamente.

El cruzamiento de *M. acuminata* x *M. ornata*, con una posible simpatria en Birmania o el Este de Pakistán, es un cruzamiento fácil además que puede germinar bien; los híbridos (A x O y O x A) son vigorosos, pero los híbridos de la raza Burmese de *M. acuminata* representados por el clon "Calcuta 4" (IR 124) cruzado con *M. ornata* (A x O) fueron escasos con semillas muy raquíticas. Los datos anteriores muestran que hay una relación cercana entre *Rhodochlamys* (especialmente *M. laterita* y *M. ornata*) y *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (más que con la subespecie *burmanica*).

Del cruzamiento interespecífico de los diploides ($2n=22$ cromosomas) de *M. acuminata* x *M. rubra* se observó una citomorfología de los híbridos con $2n=33$ cromosomas y caracteres

morfológicos intermedios. La ocurrencia de triploides en cruzas de diploide x diploide sugirieron la formación de los gametos femeninos no reducidos en *M. acuminata*. En algunos casos, la ausencia de formación de gametos masculinos no reducidos indicaron diferencias en gametogénesis masculina y femenina en algunas especies. La formación de 11 bivalentes por PMC en híbridos, parece sugerir un apareamiento completo de todos los cromosomas de *M. acuminata* y la falta de homología con los cromosomas de *M. rubra* (Agarwal, 1988).

La meiosis en *M. acuminata* se caracteriza por la presencia de una alta frecuencia de bivalentes, con desigual distribución de cromosomas y la presencia de anafase I tardía. En *M. rubra* también fué observada una alta frecuencia de bivalentes en metafase I, aparte de éstos, cerca del 86% de las células del polen materno mostraron presencia de 1 a 3 cromosomas B apareados entre ellos y separados igualmente a los dos polos. La fertilidad del polen de *M. acuminata* (2n) fué de 72.13%, *M. rubra* (2n) 98.69% y del híbrido triploide 43.7%.

La poliploidía y la esterilidad son serios impedimentos para el mejoramiento genético de los cultivares de *Musa*. Experimentalmente la mayoría de los híbridos pueden ser inducidos o encontrados en semillas ocasionales muy pequeñas y los métodos de cruzamiento se han basado sobre cruzas entre diploides, entre tetraploides y diploides y entre triploides y diploides. Con

algunos pero no todos los padres femeninos triploides, estos tipos de cruas pueden producir híbridos tetraploides con el genotipo y aspecto general de los triploides con caracteres adicionales específicos introducidos desde el polen haploide (Shepherd, 1987).

Escalant y Teisson (1987) consideran que el cultivo de embriones maduros aislados de banano, es una herramienta útil dentro del marco de las hibridaciones interespecíficas cuando son fértiles. Esto puede permitir un efecto de prueba de precocidad del valor agronómico del material clonal obtenido sin el riesgo de perder los genotipos creados. Así mismo, este procedimiento es una prueba rápida de diferentes tratamientos (proliferación, callogénesis, obtención de neocallos).

En varias combinaciones híbridas interespecíficas en *Solanum* diploide, Abdalla y Hermsen (1972) encontraron plantas diploides partenogénicas y androgénicas. Cuando *S. verrucosum*, *S. etuberosum* y *S. bulbocostanum* se utilizaron como hembras en cruzamientos interespecíficos, se obtuvieron algunas semillas que no fueron de origen híbrido; se sospechó un origen partenogénico. Las progenies autofecundadas de *S. verrucosum* aparecieron altamente uniformes y 100% resistentes a la raza de *Phytophthora infestans*, lo cual puede ser de primordial importancia para el mejoramiento, si se buscan líneas homocigotas.

2.5 Efecto de las radiaciones en plantas

Las influencias externas como radiaciones, calor y ciertas sustancias, pueden determinar cambios específicos en el material genético o mutaciones. Las diversas combinaciones del material genético heredadas de los progenitores unidas a las mutaciones, permiten garantizar que cada uno de los individuos que integran una población sencilla, presentará ligeras diferencias. Esta variación en el contenido genético constituye la materia prima de la evolución (Sutton y Harmon, 1971).

Desde que Muller, en el año de 1927, demostró la primera inducción artificial de mutaciones mediante el efecto de altas dosis de rayos X sobre la tasa de mutación de los letales y los visibles ligados al sexo en *Drosophila*, se ha probado que las radiaciones de gran energía son uno de los mutágenos más efectivos. (Strickberger, 1974).

Los agentes físicos más comunmente usados para inducir haploides son: radiaciones ionizantes (rayos X, rayos Gamma y radioisótopos), no ionizantes como la luz ultravioleta y los choques térmicos. La mayoría de los estudios se hacen aplicando estos agentes al polen, para observar su efecto en la progenie (Lacadena, 1974).

En el Sistema Internacional de Medidas, el gray (Gy) es la

unidad de dosis absorbida; representa la energía proporcionada por la radiación ionizante a una masa de materia que equivale a un Joule por Kilogramo ($J.kg^{-1}$). Antes se reportaba la radiación en rads o en Kilorads (Kr). Un gray corresponde a 100 rads.

Los cultivares del subgrupo plátano es un grupo homogéneo pero estos fueron derivados de un número muy limitado de fuentes parentales botánicamente diferentes. A pesar de la homogeneidad botánica el cultivo se diversificó grandemente por mutaciones somáticas acumuladas dando un espectro complejo de variabilidad morfológica (De Lange, 1961; citado por Vuylsteke *et al.*, 1993).

Novak *et al.*, (1990), mencionan que los cultivos que son propagados por vía asexual son heterogéneos y en tratamiento mutagénico, podrían revelar alelos recesivos por mutación o delección de los alelos dominantes.

El efecto de las mutaciones apunta a la alteración de una o pocas características de un buen cultivar, y a veces retiene el origen genotípico inalterado.

Según Strickberger (1974), por lo general, la irradiación en la interfase temprana, antes de que se haya iniciado la síntesis del DNA, produce rupturas que más tarde aparecen como si se hubieran producido cuando el cromosoma no se ha replicado todavía (rupturas cromosómicas).

Leblanc (1991), estudió la partenogénesis inducida en *Musa ssp* para la obtención de plantas haploides utilizando polen irradiado con rayos Gamma en dosis desde 3 hasta 100 Kr. Concluye que el polen de *Musa acuminata ssp burmannicoides* y *Musa balbisiana* tipo *Tani* es capaz de germinar, alcanzar los óvulos y estimular el desarrollo de las semillas de la subespecie *burmannicoides* en cualquiera de estas dosis. Aplicó tratamientos de polinización con polen irradiado en dosis de 3 a 10 Kr, menciona que existe un desarrollo del embrión al polinizar con polen de *Musa acuminata ssp burmannicoides* en las dosis de 3 Kr, 5 Kr, 7 Kr y 8 Kr. Cuando se utilizó polen de *M. balbisiana* tipo *Tani*, determinó embriones en estas dosis pero el intervalo se amplía hasta 10 Kr. El desarrollo del endospermo es variado. Con altas dosis de radiación existe una desorganización de la cromatina.

Nicoll *et al.*, (1987) al estudiar el efecto del polen irradiado en manzana cv. "Baskatong" indicaron que la irradiación del polen altera la doble fertilización y consecuentemente el desarrollo e interacciones del embrión y endospermo, ya que están de cierto modo relacionados. La genética y el fenómeno de desarrollo están asociados con el polen irradiado; incluye daño mutacional, transferencia selectiva de genes, la transformación de la "célula huevo" (vía incorporación de fragmentos de DNA masculinos después de las dosis altas de irradiación al polen) y el efecto "Mentor" del polen usado para superar barreras de incompatibilidad. Los grados de las formas maternas de la progenie

madura se infieren de la frecuencia de los genes marcadores transferidos, llevados por el polen irradiado.

Estos autores estudiaron los efectos citológicos del polen irradiado con rayos Gamma a 50 y 100 Kr (kilorads), sobre el desarrollo del embrión y endospermo en la cruce de *Malus x doméstica*. Tanto la semilla como la fruta se redujeron al incrementar las dosis de irradiación al polen, mientras que en los sacos embrionarios, los tratamientos resultaron diferentes en morfología y número de núcleos endospérmicos, así como en la presencia o ausencia del embrión. Se distinguieron anomalías nucleares en sacos embrionarios derivados de polen irradiado. En dosis altas de irradiación al polen (100 Kr) se generalizó toda o ninguna respuesta en el saco embrionario, creando cada cual, embriones anormales y/o endospermos abortivos o bien mostraron desarrollo relativamente normal. Los callos producidos del endospermo celular excitado, difirieron en el tamaño promedio del genoma, siendo éstos más pequeños al compararse con polen sin irradiación.

Zhang *et al.* (1988) utilizaron las variedades de manzana "Erovan" y "Lodi", las cuales fueron polinizadas con polen marcador para el gen R, e irradiado con rayos Gamma (Co^{60}) en dosis de 500, 1000 y 1500 Gy. Se obtuvieron plantas haploides ($2n=x=17$) de "Erovan", después del cultivo *in vitro* de las semillas inmaduras removidas de 7 a 13 semanas después de la polinización.

Posteriormente, Zhang y Lespinasse (1991) analizaron cuatro genotipos de manzana (*Malus x domestica*), siendo Erovan, Golden Delicious, R1-49 y X6677, para estudiar el desarrollo de los frutos, semillas y plantas partenogenéticas, usando polen irradiado en un intervalo de 125 a 1000 Gy.

Se extrajeron los embriones inmaduros de las semillas, dos a tres meses después de la polinización, se cultivaron *in vitro* y germinaron a los dos meses con tratamiento de frío (3°C) y oscuridad. Posteriormente se transfirieron a cámara de cultivo a 24°C con un fotoperíodo de 16 horas a 40-60 $\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Concluyeron que la mayoría de los embriones derivados de los tratamientos con polen irradiado no fueron viables, es decir, que no germinaron o murieron poco después de la germinación. Lo anterior puede deberse a una acumulación importante de genes recesivos perjudiciales en manzana, la cual es una especie alógama y propagada en forma vegetativa y estos genes pueden expresarse en haploides. Se detectaron plantas haploides partenogenéticas solo en el caso de polen tratado con dosis entre 200 y 500 Gy.

En *Nicotiana*, Virk *et al.*, (1977) investigaron la posibilidad de obtener líneas puras por desarrollo de semillas matromorfos. Se polinizaron progenitores maternos por los marcadores dominantes heterocigotos, con diferentes especies de *Nicotiana* y con polen irradiado de *N. rustica*, que contiene los marcadores dominantes.

Las polinizaciones con 65 especies y polen varietal irradiado recibieron dosis en intervalo de 8 a 40 Kr, ejecutados con rayos Gamma y X sobre todos los genotipos maternos. Las progenies matromórficas promisorias fueron estudiadas por la segregación de los genes marcadores y caracteres cuantitativos promedio y por las anomalías en la primera y segunda generación después de su inducción.

Del total de polinizaciones solo fué reconocido un diploide homocigoto materno de los padres maternos F1 (V5 x V1) polinizados con *N. langsdorffi* ($2n=18$). Las polinizaciones con *N. langsdorffi*, frecuentemente inducen haploides o haploides cercanos. La transferencia de un gen marcador dominante del polen irradiado a un progenitor materno triple recesivo tiene posibles aplicaciones en la producción de líneas isogénicas como una alternativa al retrocruzamiento recurrente.

Al estudiar el "efecto Hertwig" en plantas, Pandey y Phung (1982) estudiaron la inducción de partenogénesis en *Nicotiana* mediante el uso de polen irradiado con dosis de 10, 15, 20, 25, 30, 50 y 100 Kr en los cruzamientos: *N. langsdorffi* ($2n=18$) x *N. langsdorffi* ($2n=18$), *N. langsdorffi* x *N. alata* ($2n=18$) y *N. tabacum* ($2n=48$) x *N. alata*. A dosis bajas (10-20 Kr) se produjo gran cantidad de plantitas que disminuyeron rápidamente, muriendo muchas de éstas después de la germinación o antes de la madurez.

En la combinación intraespecífica de *N. langsdorffi* x *N. langsdorffi*, las semillas viables fueron producidas únicamente a la dosis más baja de 10 y 15 Kr. En el cruce *N. langsdorffi* x *N. alata*, a las dosis más bajas las plantas florecieron y mostraron formas híbridas variables con relación a la forma, tamaño y color, con varios grados de esterilidad, incluyendo la esterilidad total y no hubo plantas semejantes a la madre.

En la combinación *N. tabacum* x *N. alata*, pocas plantas sobrevivieron a las dosis más bajas, siendo estas dihaploides maternas (1 planta de 4 a dosis de 15 Kr) en tetraploides de *N. tabacum* (las 5 plantas a una dosis de 20 Kr). Todas las plantas sobrevivientes a dosis mayores (50 y 100 Kr) fueron tetraploides maternas. En la combinación *N. tabacum* x *N. glutinosa*, todas las plantas producidas a menos de 20 Kr fueron casi todas aneuploides o híbridos triploides. Las plantas *N. tabacum* maternas dihaploides aparecieron en dosis de 20 Kr o más. A dosis mayores de 50 Kr la mayor parte de las plantas producidas fué *N. tabacum* dihaploide materno a tetraploide.

No se ha reportado la obtención de plantas tetraploides maternas de origen partenogenético en cruces normales con polen no irradiado en *N. tabacum*. Sin embargo de la combinación de *N. tabacum* x *N. glutinosa*, se obtuvo una planta híbrida pentaploide, tetraploide + (2n=48 + 12) con dosis de 10 Kr. Lo anterior muestra que la diploidía partenogenética puede, ocasionalmente, no solo

presentarse a dosis más bajas sino además en cruzamientos con fertilización normal, resultando en el mantenimiento de tantos como 12 cuerpos o fragmentos cromosomales del padre irradiado. También es posible que en la especie tetraploide *N. rustica*, la transferencia del gen pueda estar asociada con las plantas tetraploides-aneuploides, teniendo ciertos segmentos genéticos del padre donante irradiado.

Al parecer en *Nicotiana*, la transformación del huevo combinada con la diploidía partenogenética, puede dar mayores resultados y mejorarse éstos con dosis más altas. (Phandey y Phung, 1982).

Vassileva-Dryanovska (1966b), estudió en *Lilium speciarum* la inducción de embriones haploides y núcleos endospérmicos tetraploides con polen maduro irradiado con rayos X o Gamma entre 1 a 500 Kr. Colectó pistilos en diferentes estados de desarrollo desde 1 a 30 días después de la polinización, para el estudio citológico. Concluye que hay dos caminos diferentes de formación de embriones haploides o núcleo endospérmico tetraploide, después de la polinización con polen irradiado con altas exposiciones: 1) después de la estimulación del núcleo femenino para dividirse mediante la cromatina masculina pícnotica y 2) después de la estimulación de los núcleos huevo o seudogaméticamente dividido bajo la influencia del endospermo desarrollado.

Según sean las anomalías en la cromatina masculina el proceso de fertilización es doble o simple. La fertilización doble se presenta cuando un tubo polínico llega al saco embrionario llevando dos núcleos espermáticos o dos tubos con núcleo germinativo sin dividir (1 a 500 Kr). La simple fertilización se realiza como una fertilización de solo el núcleo polar y está fundamentado cuando al saco embrionario ha llegado solo un tubo polínico con un núcleo generativo sin dividir (50-500 Kr)

En todas las exposiciones un intervalo de 1-500 Kr, empezó la degeneración temprana (20 -25 días después de la polinización) en el embrión, lo cual es más pronunciado en el endospermo. Con las exposiciones bajas el endospermo continuó la división con fuertes anomalías, 30 días después de la polinización pero finalmente degeneraron. A altas exposiciones todos los sacos embrionarios fueron degenerados 30 días después de la polinización. Las semillas se formaron con exposiciones entre 1 a 5 Kr (Vassileva-Dryanovska, 1966b).

Evaluando el efecto del polen irradiado en *Tradescantia*, Vassileva-Dryanovska (1966a) realizó un estudio similar al reportado en el párrafo anterior. Las observaciones realizadas a altas dosis muestran que la cromatina masculina, cuando es de forma densa o una masa individual, puede estimular un núcleo femenino o dividirse sin tener que fusionarse. La cromatina masculina en estas células hijas, justo antes de la división, aparecen como una

masa desorganizada de la cromatina. Por esta razón, es altamente probable para que no se formen cromosomas o fragmentos libres de la cromatina masculina durante la división meiótica de la cromatina femenina. El promedio de embriones de dos células tiene núcleo de tamaño desigual.

En varios experimentos de Pandey (1980b) donde en la mayoría de los casos el polen irradiado actuó como "Mentor" permitió la autofertilización y el establecimiento de la semilla y simultáneamente suministró una fuente de desechos genéticos que llevaron a los eventos de transformación. En algunos casos también se observó transformación de genes cuando se usó únicamente polen irradiado, consecuentemente el polen irradiado estimula la duplicación del huevo y la partenogénesis, además de suministrar los desechos genéticos necesarios para la transformación de genes.

Considerando los resultados de Pandey, Sanford *et al.* (1984), intentaron la posible inducción de la transformación de la célula huevo en tomate (*Lycopersicum esculentum*), usando combinaciones con polen irradiado, no irradiado y combinación de éstos con polen de la misma planta. No se encontraron transformantes después de analizar 5,620 semillas representando 22,300 eventos de transformación potencial. Concluyen que si la transformación del huevo ocurre puede limitarse a otras especies.

La partenogénesis inducida en la fruta kiwi (*Actinidia deliciosa*) mediante el uso de polen irradiado, fué reportada por Pandey *et al.*, (1990). La planta es una vid trepadora de hoja cáduca, la polinización es realizada por insectos, particularmente abejas y en menor grado por el viento.

La propagación del kiwi se realiza principalmente por esquejes e injertos. El cultivo en Nueva Zelanda es monoclonal, lo cual lo hace vulnerable a enfermedades y plagas. Esta especie es de alta poliploidía con número cromosómico somático de $2n=6x=170$. Se realizaron un total de 479 polinizaciones participando tres cultivares hembras receptoras, con polen donante de cinco machos y dos hermafroditas.

Se estudió el desarrollo partenogenético de las semillas después de la polinización con polen irradiado con las dosis de 0.5, 0.7 y 0.9 KGy, todas las dosis produjeron semillas partenogénicas.

La dosis de 0.7 KGy produjo el mayor número de semillas germinadas (708 de un total de 723), de las cuales 609 formaron plántulas y 334 sobrevivieron o desarrollaron plantas. El nivel de ploidía fué evaluado por estudios citológicos y tamaño de la célula guardia estomatal. Se evaluaron un total de 416 plantas, de las cuales 332 fueron hexaploides ("diploides" $2n=170$) y 84 fueron triploides ("haploides" $2n=85$).

Los resultados obtenidos en kiwi, muestran que los genotipos de polen donante y el receptor femenino influyen el número de semillas partenogénicas producidas.

2.6 Uso de marcadores

Actualmente hay mucha importancia en la conservación de los recursos fitogenéticos como fuente de diversidad, indispensable en la agricultura sostenible, pero hay poca información en las especies tropicales. Para caracterizar el germoplasma, tradicionalmente se han utilizado descriptores morfológicos o "marcadores", aunque se tiende al uso de marcadores genéticos.

2.6.1 Marcadores morfológicos

En la caracterización de las especies vegetales estudiadas el uso de marcadores morfológicos como indicadores de diversidad han sugerido que para las características cuantitativas, las medidas de diversidad basadas en la variación de caracteres morfológicos, no pueden ser confiables como indicadores de diversidad a nivel de un gen.

Las características morfológicas frecuentemente están influenciadas por variables ambientales. Contrariamente, la expresión isoenzimática es generalmente independiente a las

influencias ambientales de la planta como un todo y está libre de interacciones epistáticas (Jarret 1987).

2.6.2 Isoenzimas como marcadores genéticos

Las proteínas son biomoléculas constituidas por aminoácidos y organizados en unidades estructurales. Dentro de un organismo las proteínas pueden formar parte de estructuras (la actina, en los microfilamentos del uso acromático), pueden ser reservorios nutritivos (la faseolina), o realizar una función catalítica (las enzimas). Las enzimas son proteínas que ejercen una función catalítica específica, es decir, aceleran las reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula. Las enzimas pueden ser desde monómeros (una cadena de polipeptidos) hasta complejos multiméricos (más de una cadena polipeptídica asociada por medio de enlaces no covalentes), que desarrollan reacciones catalíticas muy complejas, como la duplicación de ADN (Ramirez *et al.*, 1991).

Dependiendo del pH, las proteínas exhiben ionización en los grupos básico o ácido. En un campo eléctrico, migran proteínas ionizadas en un gel y separadas en función de cargas y tamaño, por lo que se mueven diferentemente en el gel. La observación de los sitios de las isoenzimas se lleva fuera con una tinción acertando en la actividad enzimática (Lebrum y Chevalier, 1989).

Según Pasteur *et al.* (1987), después del revelado, aparece un número más o menos importante de "bandas" al nivel de los extractos de cada individuo. Estas bandas son llamadas isoenzimas y probablemente correspondan a: 1) productos auxiliares de la expresión de más genes situados en el mismo locus, 2) productos auxiliares de la expresión de más alelos del mismo gen y a un solo locus, 3) moléculas resultantes de cambios de conformación de una misma molécula protéica ó 4) moléculas sintetizadas por un mismo gen o grupo de genes, habiendo ocurrido diversas transformaciones post-traduccionales.

Son isoenzimas las diferentes formas moleculares de una misma enzima, afines al mismo sustrato (Markert y Moller, 1959).

El hallazgo de ligamiento entre las isoenzimas y los genes que gobiernan las características cuantitativas, ha permitido estimar el número de genes e interacciones genéticas que determinan esas características (Rick, 1983).

De acuerdo con Pasteur *et al.* (1987), los genes codificadores de las proteínas presentan dos propiedades que identifican un material de dos genotipos. La primera es que, una proporción importante de estos genes son polimorfos; con ésto se dice que ellos existen solo en forma de dos o más alelos. La segunda se refiere a que los alelos de los genes codificadores de las proteínas son generalmente codominantes; es decir que cada alelo

aparece durante los heterocigotos, lo cual está asociado con los genotipos observados y esperados.

Las enzimas son parte de las proteínas, una mutación a nivel de la estructura de un gen produce teóricamente una modificación de la carga neta de la proteína una vez por cada cuatro. Las mutaciones afectan la masa molecular y es posible detectarlas en electroforesis con gel de poliacrilamida (separación en función de la carga neta y del tamaño de las proteínas). Las mutaciones afectan la expresión de un gen (alelos nulos) o la actividad enzimática (alelos muertos) que se detectan igual (Horry, 1989).

Se han estudiado las isoenzimas en muchos cultivos y recientemente en cultivos perenes donde hay pocos marcadores genéticos. Han sido confiables para determinar el parentesco original de cultivares híbridos y el grado de diversidad genética dentro y entre cultivares, son una ayuda para el mapeo genético y estudios filotaxonómicos (Jarret, 1987; Jarret y Litz, 1986).

La identificación de los híbridos con isoenzimas, se basa en la codominancia con una propiedad que los caracteriza y que permite la detección de genotipos heterocigotos. En los programas dirigidos a la obtención de haploides se pueden detectar los individuos homocigóticos que se expresarán como fenotipos de una sola banda enzimática (Quiroz, 1991).

Montgomery y Sgarbieri (1975) estudiaron los sustratos e inhibidores de la polifenol oxidasa (PPO) en un cultivar del grupo Cavendish.

Realizaron electroforesis con gel de poliacrilamida y revelaron nueve enzimas polifenol oxidasas en el interior de la pulpa de banano, ocho en el exterior y diez en la cáscara. Las enzimas del exterior e interior de la pulpa presentaron similares movilidades relativas (Rm).

Al estudiar el polimorfismo en *Musa acuminata* Colla, Jarret y Litz (1986a) evaluaron muestras de tejido de hojas de 35 clones de *Musa acuminata* Colla con subespecies y *Musa balbisiana*, con el objeto de encontrar variación isoenzimática por malato deshidrogenasa (MDH), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), Shikimato deshidrogenasa (SADH), fosfoglucomutasa (PGM), tetrazolium oxidasa (TO), peroxidasa (PRX), catalasa (CAT) y esterasa (EST). Se detectó polimorfismo en todos los sistemas enzimáticos examinados. Identificaron ciertos alelos de las subespecies *microcarpa*, *burmanica*, *errans* y *zebrina*.

Una comparación de las isoenzimas presentes en el tejido de hoja de subespecies diploides fértiles silvestres y de *M. balbisiana* con aquellas presentes en los cultivares triploides cultivados "Valery" y "Chato", confirma el origen biespecífico del "Chato". Los resultados obtenidos indican que los diploides

fértiles son útiles para estudiar la herencia de los marcadores isoenzimáticos y que éstos pueden ser usados para identificar cultivares, especies y subespecies comerciales.

Los mismos autores (1986b) estudiaron 34 clones de banano y plátano representando varios niveles de ploidía y el diploide *M. balbisiana*, para analizar los sistemas enzimáticos de MDH, PGM, GOT, SADH y PRX. El polimorfismo se detectó en todas los cinco sistemas. Los cuatro clones principales de Cavendish: Robusta, Cavendish gigante, Cavendish enano, y Pisang masak hijau, fueron monomórficos para isoenzimas de diez enzimas adicionales.

En el estudio titulado análisis electroforético de isoenzimas seleccionadas en cultivares BB de bananos filipinos, Espino y Pimentel (1988), analizaron los sistemas enzimáticos, ácido shikimico deshidrogenasa (SKDH), malato deshidrogenasa (MDH) y glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT).

Horry (1989), estudió la quimiotaxonomía y organización genética del género *Musa*. Considera que la organización y la evolución del cultivo no está dilucidada claramente a través de datos morfológicos y citogenéticos; analizó la diversificación con el uso de dos marcadores bioquímicos, flavonoides e isoenzimas. El análisis de la diversidad enzimática de 113 variedades silvestres cultivadas, a través de ocho loci polimórficos, mostró una gran divergencia entre especies de *M. acuminata* y *M. balbisiana*.

La diversidad entre las especies de *M. acuminata* es alta y su estructuración refleja un probable compartimento debido a un aislamiento reproductivo parcial de naturaleza geográfica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a través del polimorfismo de flavonoides. La comparación entre *acuminata* silvestre y los cultivares revela que la domesticación ha operado con una base genética reducida.

Las clasificaciones obtenidas a través de los dos tipos de marcadores, corrobora globalmente previas clasificaciones basadas sobre datos morfofisiológicos. La electroforesis de isoenzimas aplicadas a bananos de los sistemas enzimáticos: MDH, PRX, PGM, SKDH y AAP han sido eficientes y promisorios, para la investigación de las fuentes genéticas así como para la clasificación y selección.

3. MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología, perteneciente al Area de Mejoramiento de Cultivos Tropicales en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), con sede en Turrialba, Costa Rica.

Para dar los tratamientos de irradiación al polen, se contó con la colaboración del Laboratorio de Investigación en Mosca del Mediterráneo, proyecto entre la Universidad de Costa Rica, Comunidad Económica Europea y el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, en la ciudad de San José, Costa Rica.

3.1 Material vegetal

Se utilizó material vegetal de la Colección de Musáceas del CATIE, localizada en la sección Cabiria. Los progenitores femeninos estudiados en este trabajo son los genotipos: *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* tipo Calcuta 4 y *M. acuminata* ssp *malaccensis*. Se utilizó el polen de *M. balbisiana* tipo Tani y las especies ornamentales *M. ornata* y *M. beccarii*.

3.2 Equipo y dosis de irradiación al polen

La radiación aplicada al polen fue de tipo Gamma, producida

por una fuente de Cobalto 60, otorgada con una eficiencia de 4.3459 Gy por minuto.

Considerando los resultados de Leblanc (1991), se evaluaron los siguientes tratamientos de radiación al polen: *M. balbisiana* tipo *Tani* con 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 170, 200, 220, 250 y 300 Gy. A las especies ornamentales: *M. ornata* 120, 150, 170 y 220 Gy y *M. beccarii* 70, 80, 90, 100, 120, 150 y 170 Gy.

3.3 Cruzamientos interespecíficos

Se polinizaron un total de 15 plantas de la subespecie *burmannicoides* tipo Calcuta 4 y seis de *malaccensis*, con el aprovechamiento de todas las inflorescencias emergidas durante el periodo de septiembre de 1992 a febrero de 1993.

Para la realización de los cruzamientos interespecíficos se consideró el siguiente procedimiento: identificar las plantas próximas a la emergencia del racimo; posterior a la emergencia cubrir éste con bolsa de tela de textura delgada (malin) para evitar contaminación con polen extraño el cual es transportado por insectos.

Se monitoreó diariamente el grado de desarrollo del racimo, para efectuar las polinizaciones, al confirmar la emergencia de las primeras inflorescencias (flores femeninas).

El polen para irradiación se colectó fresco de la inflorescencia -1; es decir, aquella que abriría al siguiente día, usando recipientes de acrílico. Considerando los resultados de Leblanc (1991), la conservación fue a 9°C por un periodo máximo de 48 horas. Las cruzas con polen no irradiado se hicieron al momento de apertura.

Los tratamientos de polinización fueron aleatorios en cada una de las subespecies estudiadas, considerando las limitantes por emergencia de las inflorescencias así como disponibilidad de la fuente de cobalto. Se muestran en el cuadro 1.

3.4 Muestreo de frutos

En cada planta se tomaron muestras aleatorias de tres frutos por cada tratamiento (mano). Los frutos obtenidos de los tratamientos sin irradiación se muestrearon a los 90 días después de la polinización. Al observar el poco desarrollo de los embriones de los cruzamientos con polen irradiado, se decidió muestrear los frutos a los 120 días después de la polinización.

Cuadro 1. Cruzamientos interespecíficos y dosis de irradiación al polen estudiados en *Musa* ssp. CATIE. Turrialba, C.R.

Hembra		Macho
<i>burmannicoides</i>	x	<i>burmannicoides</i> (0 Gy)
<i>burmannicoides</i>	x	<i>tani</i> (0 Gy)
<i>burmannicoides</i>	x	<i>tani</i> (70, 80, 90, 100, 120, 150, 170, 200 y 220 Gy)
<i>burmannicoides</i>	x	<i>beccarii</i> (0 Gy)
<i>burmannicoides</i>	x	<i>beccarii</i> (70, 80, 90, 120, 150 y 170 Gy)
<i>burmannicoides</i>	x	<i>ornata</i> (0 Gy)
<i>burmannicoides</i>	x	<i>ornata</i> (120, 150, 170 y 220 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>malaccensis</i> (0 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>burmannicoides</i> (0 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>tani</i> (0 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>tani</i> (60, 80, 90, 100, 120, 170, 220, 250 y 300 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>beccarii</i> (0 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>beccarii</i> (100 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>ornata</i> (0 Gy)
<i>malaccensis</i>	x	<i>ornata</i> (170 y 220 Gy)

3.5 Identificación de las semillas

Todos los frutos muestreados se llevaron al laboratorio, para contar las semillas en condiciones asépticas. Se Procedió a cortar transversalmente cada una de ellas para luego observarlas en el estereoscopio, clasificandolas dentro de los siguientes tipos:

Tipo	Constitución de la semilla
I	Con embrión y con endospermo
II	Con embrión y sin endospermo
III	Sin embrión y con endospermo
IV	Sin embrión y sin endospermo

El análisis de los tipos de semillas se realizó expresando los valores reales a valores porcentuales.

3.6 Rescate de embriones

Simultáneamente al conteo de las semillas se realizó el rescate de los embriones cigóticos (en semillas tipo I y II). En las semillas tipo I, se supone que se presentó una doble fertilización, puesto que hay formación de embrión y endospermo, sin embargo también pueden ocurrir alteraciones por la irradiación y los cruzamientos interespecíficos. El rescate de los embriones de semillas tipo II, se realizó considerando la ausencia de

endospermo en la semilla, como un indicador de alteración de la doble fertilización.

3.7 Cultivo *in vitro* de embriones

Los embriones obtenidos se sembraron en medio de cultivo de germinación MS (anexo 1) con AIA (2 mg.l^{-1}) y BAP (0.5 mg.l^{-1}). Después de germinados se transfirieron a medio de desarrollo MS.

3.8 Adaptación de las plantas

Cuando las plantas, en el medio de desarrollo, alcanzaron una altura promedio de diez centímetros, se pasaron a condiciones de invernadero, usando una mezcla de suelo y arena en partes iguales, para facilitar el desarrollo radicular.

3.9 Densidad estomática

A las plantas presentes en el invernadero se les cuantificó el número de estomas en el haz y en el envés de la hoja número 1. La muestra se tomó aplicando esmalte transparente sobre la parte central de la hoja. Al secarse se desprende cuidadosamente y se coloca sobre un portaobjetos para su observación al microscopio. Con este propósito se consideró el promedio de diez campos ópticos con un aumento de 250X.

3.10 Conteos cromosómicos

Con objeto de conocer el comportamiento cromosómico de las plantas obtenidas por cruzamientos interespecíficos, se prepararon muestras para conteos cromosómicos. Se empleó la metodología reportada en el manual de laboratorio del CIRAD y la técnica utilizada por el Dr. Frederic Bakry (Comunicación personal), en las Islas Guadalupe. Además se consideraron las experiencias prácticas del Dr. Naggib Nassar.

Se cortaron las puntas de la raíz a diferentes horas del día y se colocaron en una solución de 8-hidroxiquinoleína al 0.03% (0.002 M); se aplicó vacío durante 15 minutos para facilitar la difusión de la hidroxiquinoleína por un periodo de 4 horas.

Transcurrido este tiempo se pasaron las puntas de la raíz a una solución con agua, ácido acético y etanol al 95%, en proporciones de 5:4:1, durante 12 horas a -4°C . Para la conservación se colocan las puntas en alcohol al 70%.

3.11 Electroforesis de isoenzimas

Con objeto de identificar genéticamente el grado de homocigosis en las plantas resultantes de los cruzamientos interespecíficos en etapas tempranas de su desarrollo, se aplicó la técnica de electroforesis por isoenzimas, de acuerdo con la

metodología que emplea el Dr. Jean Pierre Horry en la estación experimental del CIRAD-FLHOR, en Neufchâteau, Islas Guadalupe, Francia (Comunicación personal).

Para obtener las muestras de las plantas del invernadero, se utilizó toda la hoja No.2 y en plantas adultas una área foliar de 50 cm, cerca de la nervadura central en la hoja cero o "cigarro".

Las enzimas fueron extraídas a 4 °C por maceración de la muestra foliar en un mortero, agregando 2 ml de la solución extractora (anexo 2), 0.25 gr de polivinilpolipirrolidona y 0.50 gr de arena para facilitar la molienda. Los extractos crudos fueron centrifugados a 12 000 rpm a 4 °C durante 60 minutos. Se toman alícuotas de 100 ul identificadas respectivamente. Las muestras se conservaron a una temperatura de -18 °C.

Se preparó un gel horizontal al 13% de almidón (anexo 3) con 20 ml de la solución amortiguadora Tris citrato pH 7.0 (ver el anexo 4). Las dimensiones del gel son 1cm x 17cm x 19cm. Es recomendable mantener el gel a 4 °C durante 30 minutos previos a la absorción de la muestra sobre trocitos de papel absorbente Whatman No.3, con dimensiones de 1cm x 0.5cm, para posteriormente colocarse sobre el gel. En el anexo 5 se muestra la figura de la placa de migración del gel. El tiempo de migración es de 5 horas con una corriente eléctrica de 45 miliamperios y 175 voltios. La solución amortiguadora es Tris citrato pH 7.0.

Después de la migración se cortó longitudinalmente el gel para revelar simultáneamente los siguientes sistemas enzimáticos: peroxidasa (PRX), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (IDH). Para mayor detalle se recomienda consultar el anexo 6, donde se describe la preparación de las soluciones reveladoras.

4. RESULTADOS

A los 90 ó 120 días después de realizar los cruzamientos en el campo, con y sin irradiación al polen, se muestrearon tres frutos por cada tratamiento motivo de estudio.

4.1 Conteo de semillas

Con base en el cuadro No. 1, presentado en el capítulo de materiales y métodos, donde aparecen todos los cruzamientos interespecíficos llevados a cabo en este trabajo; en primer término, se presentarán los resultados obtenidos en la subespecie *burmannicoides* (Bur) y después en *malaccensis* (Ma).

4.1.1 Hibridación entre *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* y *Musa balbisiana* tipo Tani, con diferentes dosis de irradiación al polen.

En el cuadro No. 2 se presentan los resultados de acuerdo a los valores porcentuales obtenidos en los cuatro tipos de semilla Tipo I (con embrión y con endospermo), tipo II (con embrión y sin endospermo), tipo III (solo con endospermo) y tipo IV cuando se consideran semillas "vanas" o "vacías", es decir sin embrión y sin endospermo.

Cuadro 2. Porcentaje de semillas obtenidas en *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* por hibridación con polen a diferentes dosis de irradiación de *M. balbisiana* tipo Tani.

CRUZA	TIPO DE SEMILLAS (%)			
	I	II	III	IV
Bur x Bur	72.17	9.24	3.13	15.46
Bur x Tani	6.19	30.79	5.67	57.35
Bur x Tani 70 Gy	1.15	16.44	9.76	72.65
Bur x Tani 80 Gy	1.84	6.96	15.64	75.56
Bur x Tani 90 Gy	1.24	2.72	9.82	86.22
Bur x Tani 100 Gy	1.07	2.07	8.01	88.85
Bur x Tani 120 Gy	0.97	3.04	12.38	83.61
Bur x Tani 150 Gy	0.45	0.69	8.47	90.39
Bur x Tani 170 Gy	0.50	0.17	9.32	90.01
Bur x Tani 200 Gy	0.33	0.20	8.09	91.38
Bur x Tani 220 Gy	0.00	0.00	5.79	94.21

Bur= *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*.

Tani=*Musa balbisiana* tipo Tani.

Semillas Tipo I

La cruce Bur x Bur produce el mayor número de semillas, su valor es un 72.17%. Al observar la figura 5, se aprecia un cambio muy radical, solo se obtiene un 6.19% de las semillas con la cruce *burmannicoides* x *balbisiana* Tani sin irradiación al polen. Si consideramos que en la naturaleza solo este tipo de semillas puede producir una nueva planta, se podría explicar la evolución de musáceas a partir de especies diploides, misma que ha estado limitada por vía sexual.

El efecto de la polinización con polen irradiado de *balbisiana* tipo Tani se manifiesta en un bajo porcentaje de semillas de este tipo. Con las dosis de 70, 80, 90 y 100 Gy se producen semillas en una proporción del 1.15%, 1.84%, 1.24% y 1.07%, respectivamente, siendo menor del 1% en dosis de 180 Gy (0.97%), 150 Gy (0.45%), 170 Gy (0.50%) y 200 Gy (0.33%); con dosis de 220 Gy no desarrollan los frutos por lo tanto no hay formación de semillas.

Aunque los valores porcentuales de las semillas provenientes de polinización con polen irradiado sean muy bajos, se pueden considerar de mucha importancia los embriones provenientes de semilla tipo I (con embrión y con endospermo), puesto que al cultivarlos *in vitro*, éstos pueden germinar y generar una planta, rescatando así la posible variabilidad acumulada.

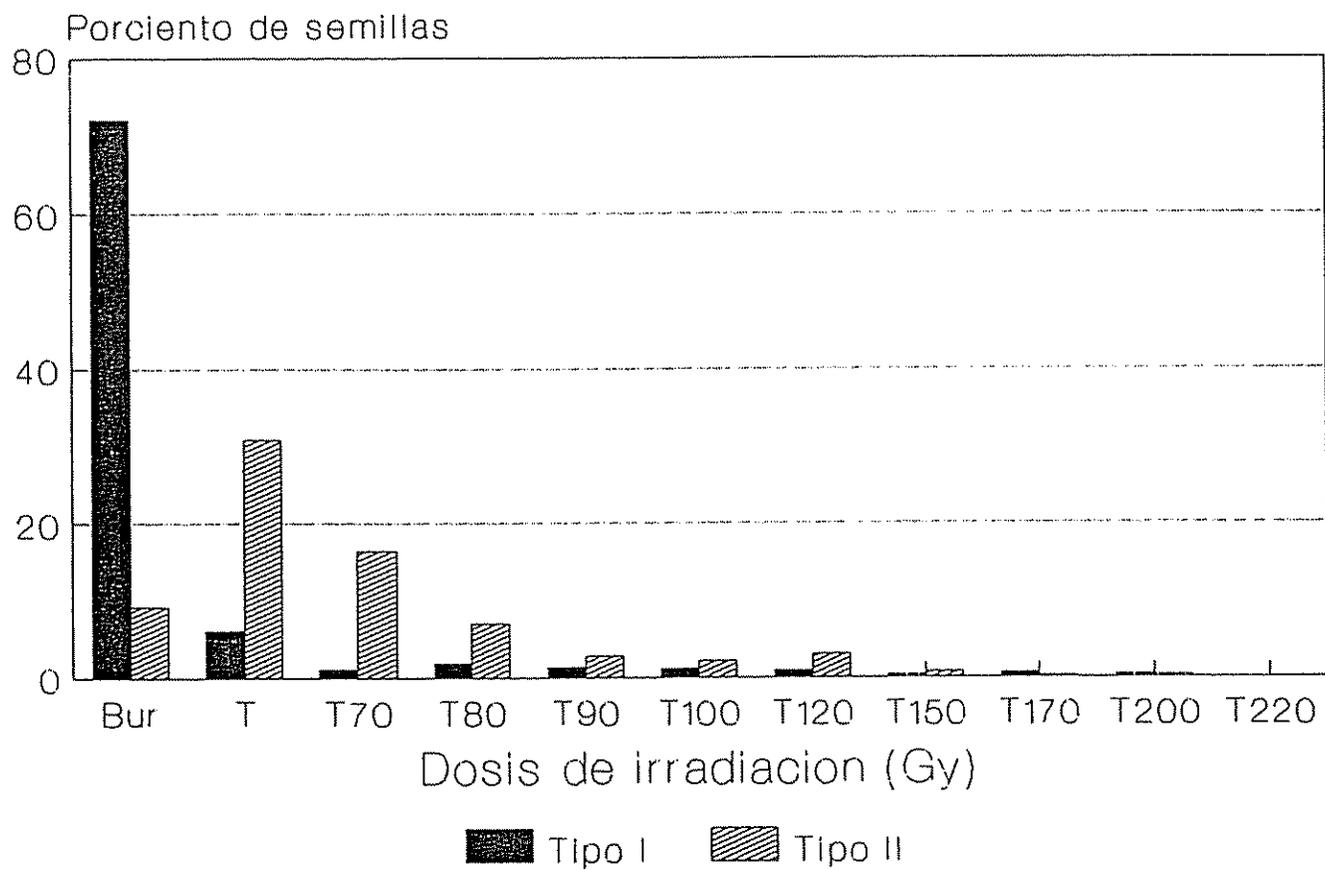


Figura 5. Porcentaje de semillas tipo I y II de Musa acuminata ssp burmannicoides obtenidas por polinización con polen de Musa balbisiana tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.

Semillas Tipo II

La cuantificación de las semillas tipo II constituye el primer objetivo de este trabajo de tesis. Donde se considera la formación de semillas con embrión y sin endospermo.

En la combinación Bur x Bur aparecieron en un 9.24%; mientras en Bur x Tani sin irradiación es 30.79%, alcanzando el máximo valor de este tipo de semillas.

Este máximo valor tiene importancia al tomar en cuenta que en condiciones naturales, los cruzamientos de *acuminata x balbisiana* no han sido diseminados con mucha facilidad, las semillas de tipo II que se producen no germinan, dado que no tienen endospermo (substancias de reserva) y por lo tanto el embrión muere.

Los cruzamientos de Bur x Tani con irradiación, tienden a disminuir en la medida que la irradiación aumenta hasta llegar a la dosis de 220 Gy donde la frecuencia es cero, coincidiendo con el comportamiento de las semillas de tipo I.

Al comparar las dosis superiores a 100 Gy, se observan las proporciones siguientes: con dosis de 120 Gy se obtiene un 3.04% de semillas, con 150 Gy un 0.69%, 170 Gy el 0.17% y 200 Gy un 0.20%. En términos de frecuencia, con dosis de 120 Gy se esperan 3 semillas Tipo II de cada 100; con 150 Gy, 1 semilla cada 145; con

170 Gy, 1 cada 588; y con 200 Gy, 1 cada 500.

Al analizar los tipos de semillas I y II, se observa que a excepción de la cruza Bur x Bur; la formación de éstas semillas tiende a disminuir conforme se aumentó la dosis de irradiación al polen, siendo más aguda la pendiente en semillas del tipo II.

Semillas Tipo III

La cruza Bur x Bur produce solo un 3.13% de semillas tipo III. Los cruzamientos interespecíficos sin y con irradiación presentan valores porcentuales que oscilan entre 5.67% (Bur x Tani sin) y 15.64% (Bur x Tani 80 Gy). Se presenta una tendencia más o menos constante en el comportamiento de todos los tratamientos. Por lo tanto se puede anotar que este tipo de semillas no se ven afectadas numéricamente en las dosis estudiadas. En la figura 6 se representa mejor dicha tendencia.

Semillas Tipo IV

En las semillas vacías se observa un claro incremento conforme se aumenta la dosis de irradiación. Los testigos Bur x Bur y Bur x Tani sin irradiar producen el 15.46% y 57.35% resp. Con polen irradiado se producen 72.65%, 75.56%, 86.22%, 88.85%, 83.61%, 90.39%, 90.01%, 91.38% y 94.21%, con las dosis de 70 Gy, 80 Gy, 90 Gy, 100 Gy, 120 Gy, 150 Gy, 170 Gy, 200 Gy y 220 Gy, resp.(fig. 6).

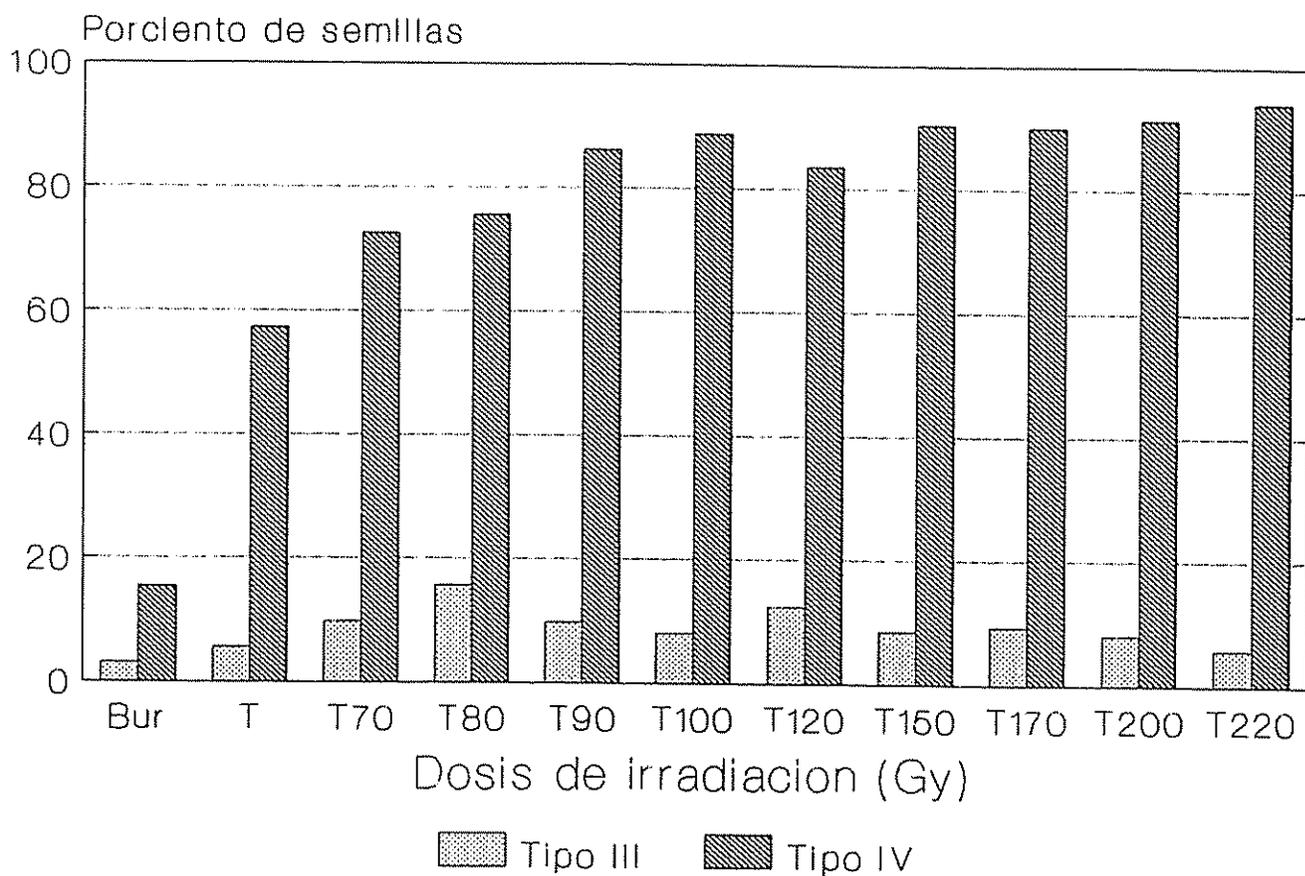


Figura 6. Porcentaje de semillas tipo III y IV de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* obtenidas por polinización con polen de *Musa balbisiana* tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.

En el anexo 7 se presentan conjuntamente los valores porcentuales de los cuatro tipos de semillas.

4.1.2 Hibridación de *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* por *Musa beccarii*.

En relación con los cruzamientos de *burmannicoides* por *beccarii*, el cuadro No. 3 muestra los resultados que se obtuvieron:

El cruce Bur x Bec sin irradiación obtuvo un 7.21% de semillas del tipo I, 14.90% del tipo II, 3.86% del tipo III y 74.03% del tipo IV.

En la cruce Bur x Bec 70 Gy solo se encontraron los tipos de semilla III y IV con 6.71% y 93.29%;

Con dosis de irradiación de 80 Gy al polen se obtuvieron 1.27% (Tipo I), 3.92% (Tipo II), 8.37% (Tipo III) y 86.44 (Tipo IV). Al aplicar dosis de 90 Gy todas las semillas encontradas en los frutos fueron vacías.

Con polen irradiado en dosis de 120 y 170 Gy, los frutos obtenidos son poco desarrollados y sin semillas. Por tal motivo se asume que no hubo fertilización o al menos no se detectó.

Cuadro 3. Porcentaje de semillas obtenidas en *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* por hibridación con polen irradiado de *M. beccarii*.

CRUZA	TIPO DE SEMILLAS (%)			
	I	II	III	IV
Bur x Bur	72.17	9.24	3.13	15.46
Bur x Bec	7.21	14.90	3.86	74.03
Bur x Bec 70 Gy	0.00	0.00	6.71	93.29
Bur x Bec 80 Gy	1.27	3.92	8.37	86.44
Bur x Bec 90 Gy	0.00	0.00	0.00	100.00
Bur x Bec 120 Gy	0.00	0.00	0.00	0.00
Bur x Bec 150 Gy	17.78	10.34	10.24	61.64
Bur x Bec 170 Gy	0.00	0.00	0.00	0.00

Bur=*Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*.

Bec= *Musa beccarii*.

En dosis de 150 Gy se produjeron semillas de los cuatro tipos: tipo I (17.78%), tipo II (10.34%), 10.24% (Tipo III) y del tipo IV (61.64%). Si analizamos detenidamente la tendencia a medida que aumentamos la dosis de irradiación al polen, ya no se espera formación de frutos normales a más de 120 Gy; sin embargo se encontraron semillas con embrión en un número superior comparativamente al tipo I de *beccarii* sin irradiación e inferior al tipo II. Tal parece que dicho comportamiento es debido a un error de muestreo, sin embargo, lo anterior se podrá confirmar hasta estudiar las plantas mediante electroforesis. Ver figura 7. Ninguno de los cruzamientos superó el porcentaje de semillas tipo I obtenido en Bur x Bur pero si fue superado el porcentaje de semillas tipo II en la cruza Bur x Bec sin irradiar. Con base en lo anterior podemos decir que el cruzamiento *burmannicoides* x *beccarii* sin irradiación, es factible de utilizar en caso de ser positiva esta metodología.

4.1.3 Hibridación de *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* por *Musa ornata*.

En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos de la hibridación de *burmannicoides* por *ornata*. En el cruce sin irradiación se produce solo el 2.02% de semillas tipo I, 0.46% del tipo II, 25.11% tipo III y 72.41 del tipo IV.

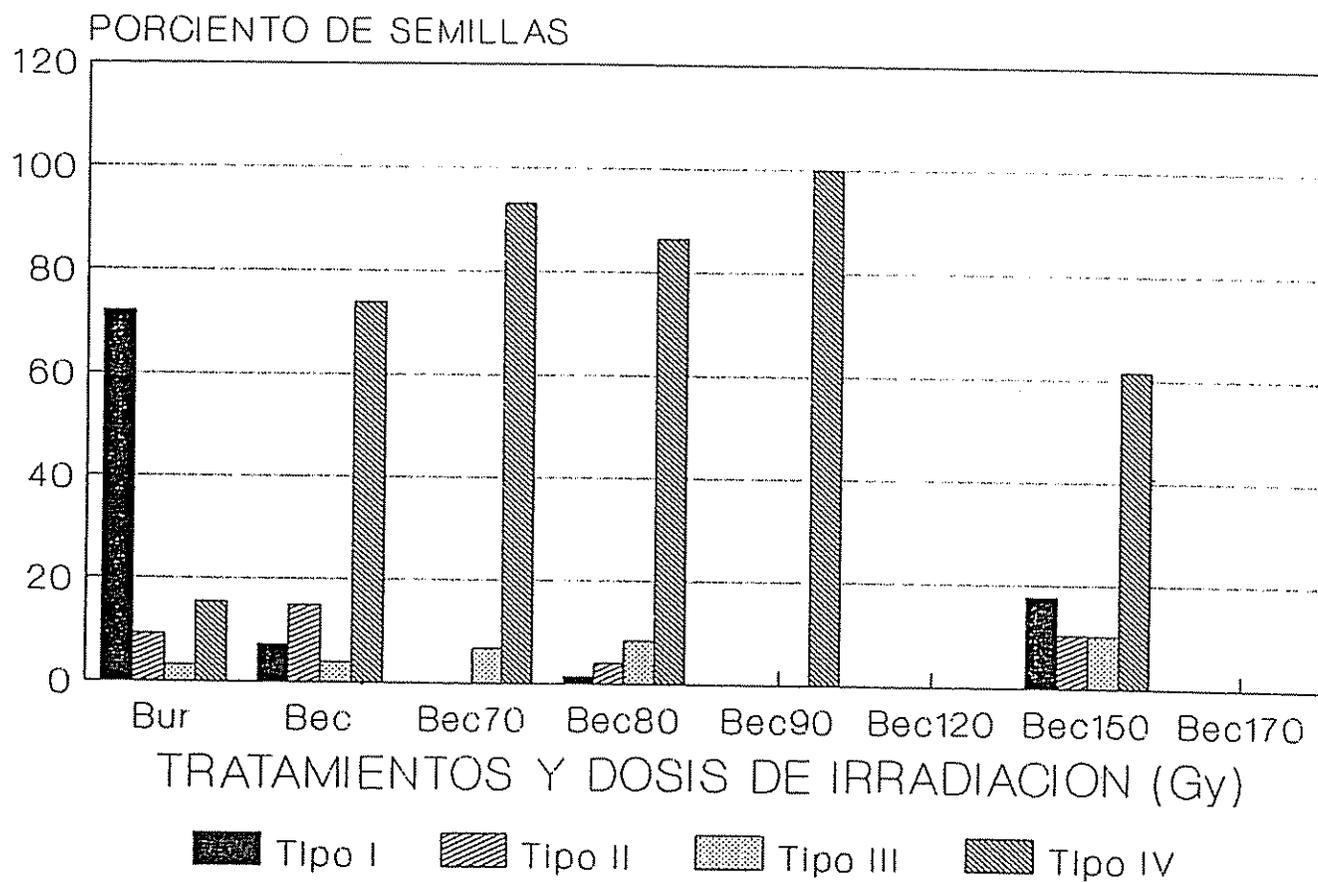


Figura 7. Porcentaje de semillas de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* obtenidas por polinización con polen de *Musa beccarii* en diferentes dosis de irradiación.

Cuadro 4. Porcentaje de semillas obtenidas por hibridación entre *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* con polen irradiado de *M. ornata*.

CRUZA	TIPO DE SEMILLAS (%)			
	I	II	III	IV
Bur x Bur	72.17	9.24	3.13	15.46
Bur x Orn	2.02	0.46	25.11	72.41
Bur x Orn 120 Gy	0.0	0.25	13.48	86.27
Bur x Orn 150 Gy	0.38	0.54	5.98	93.10
Bur x Orn 170 Gy	0.00	0.00	8.38	91.62
Bur x Orn 220 Gy	0.00	0.00	10.76	89.24

Bur= *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*.

Orn= *Musa ornata*.

Con el uso de polen irradiado a 120, 150, 170 y 220 Gy se producen altos porcentajes de semillas vacías y el comportamiento es similar. Se aprecia un porcentaje de semillas Tipo I y II menor al 1% en las dosis de 120 y 150 Gy. Con dosis de irradiación de 170 y 220 Gy solamente se producen semillas tipo III y IV, como se aprecia en la figura 8.

4.1.4 Hibridación de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* por *Musa balbisiana* tipo Tani con diferentes dosis de irradiación.

En el cuadro 5 se presentan los valores porcentuales correspondientes a los cruzamientos de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* por *Musa balbisiana* tipo Tani, con diferentes dosis de irradiación al polen y la comparación del cruzamiento intrasubespecífico de *malaccensis*.

Con el cruzamiento testigo Ma x Ma se alcanza el mayor porcentaje de semillas normales o de tipo I (93.60%) y los menores valores en los tipos II, III y IV. Las semillas tipo II solo se encuentran en un 1.16%.

Semillas Tipo I.

El más alto porcentaje de semillas de este tipo corresponde

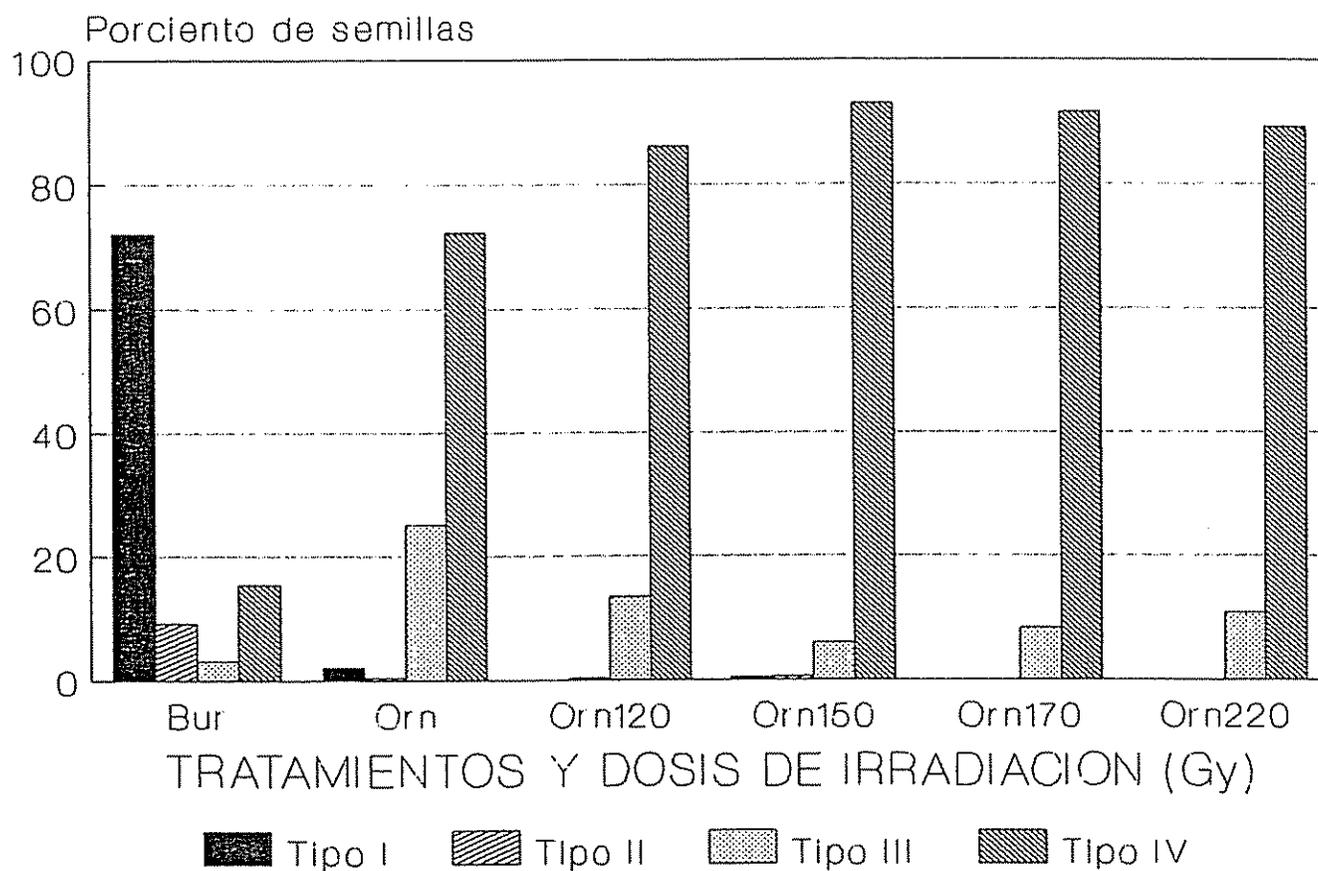


Figura 8. Porcentaje de semillas de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* obtenidas por polinización con polen de *Musa ornata*, irradiado a diferentes dosis.

Cuadro 5. Porcentaje de semillas obtenidas en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* por hibridación con *M. balbisiana* tipo Tani en diferentes tratamientos de irradiación al polen.

CRUZA	TIPO DE SEMILLAS (%)			
	I	II	III	IV
Ma x Ma	93.60	1.16	2.59	2.64
Ma x Tani	67.84	10.70	9.33	12.12
Ma x Tani 60 Gy	40.64	7.89	35.45	16.02
Ma x Tani 80 Gy	13.86	5.34	30.46	50.34
Ma x Tani 90 Gy	11.41	3.70	32.61	52.28
Ma x Tani 100 Gy	13.02	6.09	39.07	41.81
Ma x Tani 120 Gy	15.00	7.42	21.88	55.70
Ma x Tani 170 Gy	2.97	5.24	24.12	67.67
Ma x Tani 220 Gy	0.90	0.00	2.78	96.32
Ma x Tani 250 Gy	0.00	0.00	61.82	38.18
Ma x Tani 300 Gy	0.00	0.00	65.54	34.46

Ma=*Musa acuminata* ssp. *malaccensis*.

Tani=*Musa balbisiana* tipo Tani.

la cruce *Ma x Ma*, siendo 93.60%. La cruce interespecífica de *malaccensis* por *balbisiana* tipo Tani sin irradiar presenta un 67.84% de semillas tipo I.

El tratamiento de irradiación al polen en dosis de 60 Gy produce el 40.64% de semillas, mientras que en las dosis de 80, 90, 100 y 120 Gy producen el 13.86%, 11.41%, 13.02% y 15:00%, respectivamente. Con dosis de irradiación al polen de 170 Gy solo hay un 2.97% de semillas de este tipo y con 220 Gy se producen escasamente un 0.90%.

No hay respuesta al cruzamiento con polen irradiado a las dosis de 250 y 300 Gy, que se manifiesta en el bajo desarrollo de los frutos y ausencia de semillas.

Semillas tipo II:

La hibridación interespecífica de *malaccensis* por *balbisiana* tipo Tani, formó el 10.70% de estas semillas. Con base en este valor se aprecia una tendencia decreciente, a medida que la dosis de irradiación al polen es mayor y se encuentran semillas hasta la dosis de 170 Gy. En la figura 9 se grafican dichos valores. Nótese que todos los tratamientos inferiores a la dosis de 170 Gy superan la formación de este tipo de semillas comparativamente con el cruce intrasubespecífico.

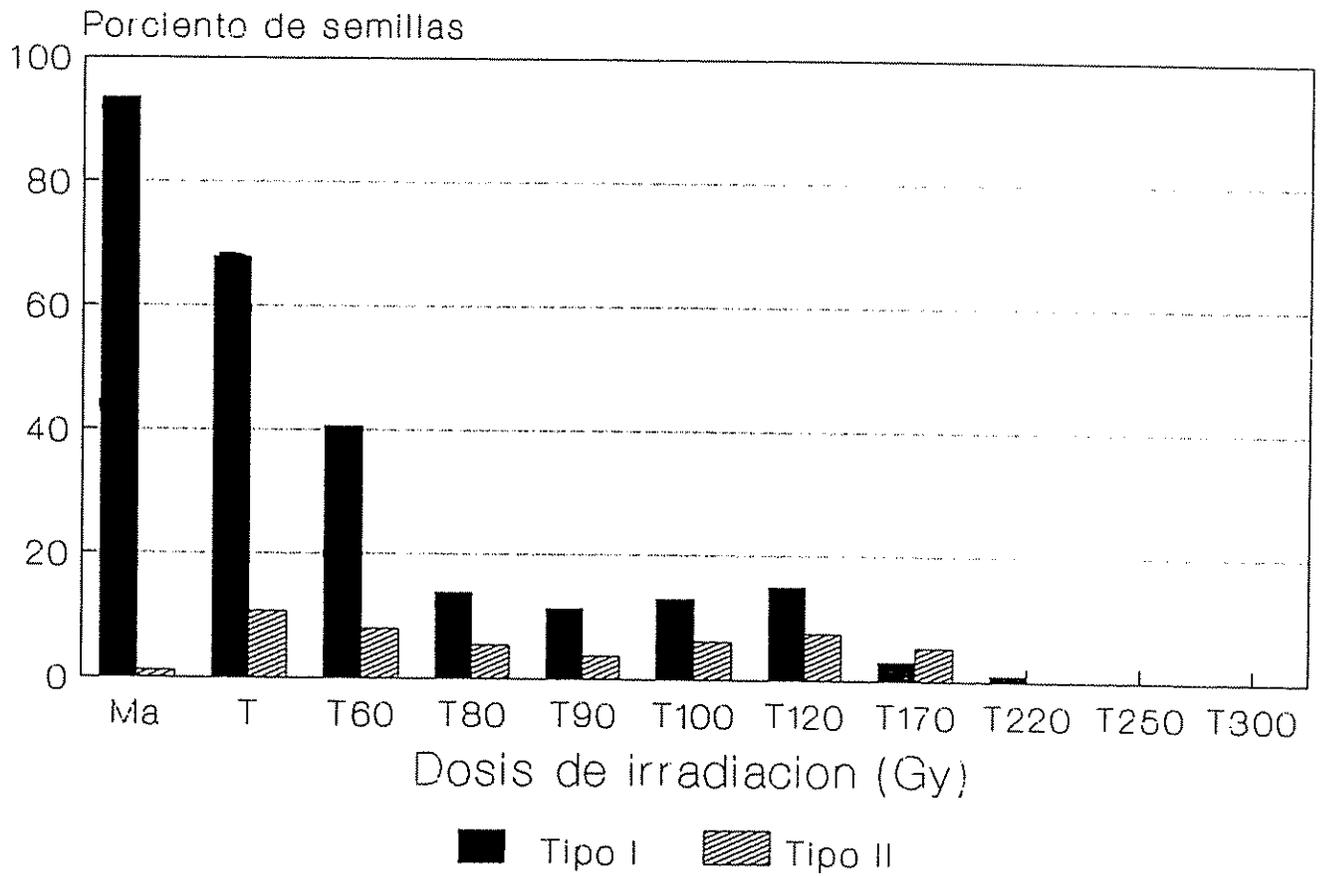


Figura 9. Porcentaje de semillas tipo I y II de *Musa acuminata* ssp *malaccensis* obtenidas por polinización con polen de *Musa balbisiana* tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.

Con base en los resultados, la dosis de irradiación de 60 Gy produce el mayor número de semillas del tipo II, con un porcentaje del 7.89% de semillas. Sin embargo; son de interés los embriones cigóticos provenientes de semillas polinizadas con polen a 120 Gy, ya que su valor porcentual obtenido es de 7.42%.

Semillas tipo III y IV

En relación a este tipo de semillas la figura 10 muestra la irregularidad en el comportamiento. Para los tratamientos de irradiación con 80 Gy, 90 Gy, 100 Gy, 120 Gy, 170 Gy y 220 Gy, la presencia de semillas "vanas" es superior a las semillas tipo III. Con 220 Gy de irradiación se producen el 96.32% de semillas del tipo IV. En el anexo 8 están los cuatro tipos de semillas.

4.1.5 Hibridación de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* con polen de las especies *Musa ornata* y *Musa beccarii*.

Los resultados de las semillas obtenidas con estos cruzamientos se presentan en el cuadro 6. En este cuadro se muestra además del cruce intrasubespecífico y la comparación con el cruce intersubespecífico entre *malaccensis* y *burmannicoides*. Ambos testigos producen las mismas proporciones de los distintos tipos de semillas. El cruce *malaccensis* por *ornata* produce el 54.29% de semillas de tipo I y solamente el 6.02% de semillas de tipo II.

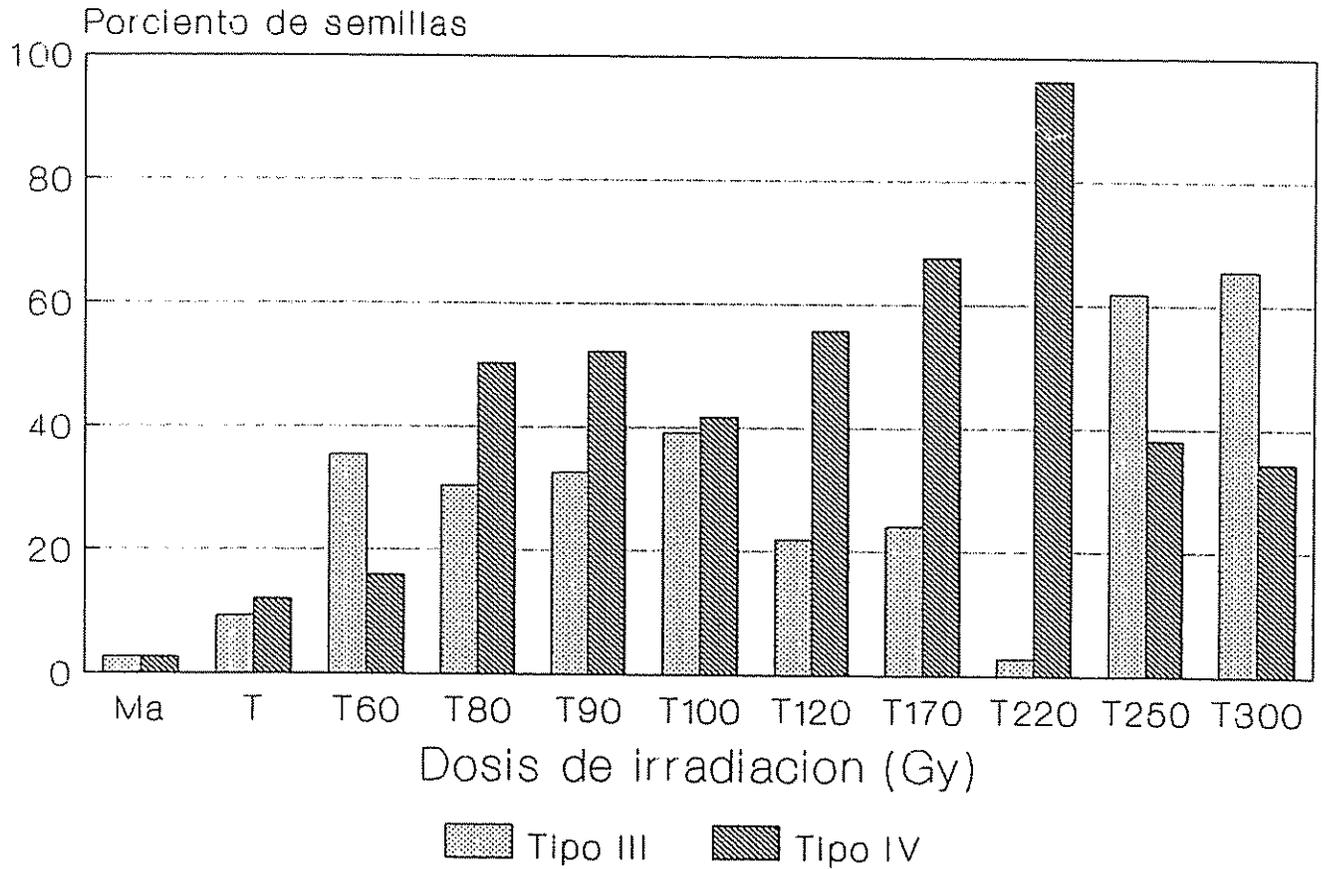


Figura 10. Porcentaje de semillas tipo III y IV de *Musa acuminata* ssp *malaccensis* obtenidas por polinización con polen de *Musa balbisiana* tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.

Cuadro 6. Porcentaje de semillas obtenidas por hibridación de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* con polen de especies ornamentales.

CRUZA	TIPO DE SEMILLAS (%)			
	I	II	III	IV
Ma x Ma	93.60	1.16	2.59	2.64
Ma x Bur	94.65	0.16	4.81	0.38
Ma x Orn	54.29	6.02	24.87	14.81
Ma x Orn 170 Gy	0.81	0.00	15.71	83.48
Ma x Orn 220 Gy	8.94	4.55	15.21	71.29
Ma x Bec	0.00	0.00	0.00	0.00
Ma x Bec 100 Gy	0.00	0.00	0.00	0.00

Ma=*Musa acuminata* ssp. *malaccensis*.

Bur= *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*.

Orn= *Musa ornata*.

Bec=*Musa beccarii*.

El polen irradiado a 170 Gy produce solo el 0.81% de semillas de tipo I, no producen semillas de tipo II, hay un 15.71% de tipo III y el 83.48% de las semillas producidas son del tipo IV. Con 220 Gy el porcentaje de semillas del tipo I se aumenta al 8.94, y se encuentra el 4.55% de semillas de tipo II. Lo anterior se expresa mejor en la figura 11.

No hay compatibilidad en la hibridación de *malaccensis* por *beccarii*, al menos en el cruzamiento sin irradiación y con irradiación de 100 Gy.

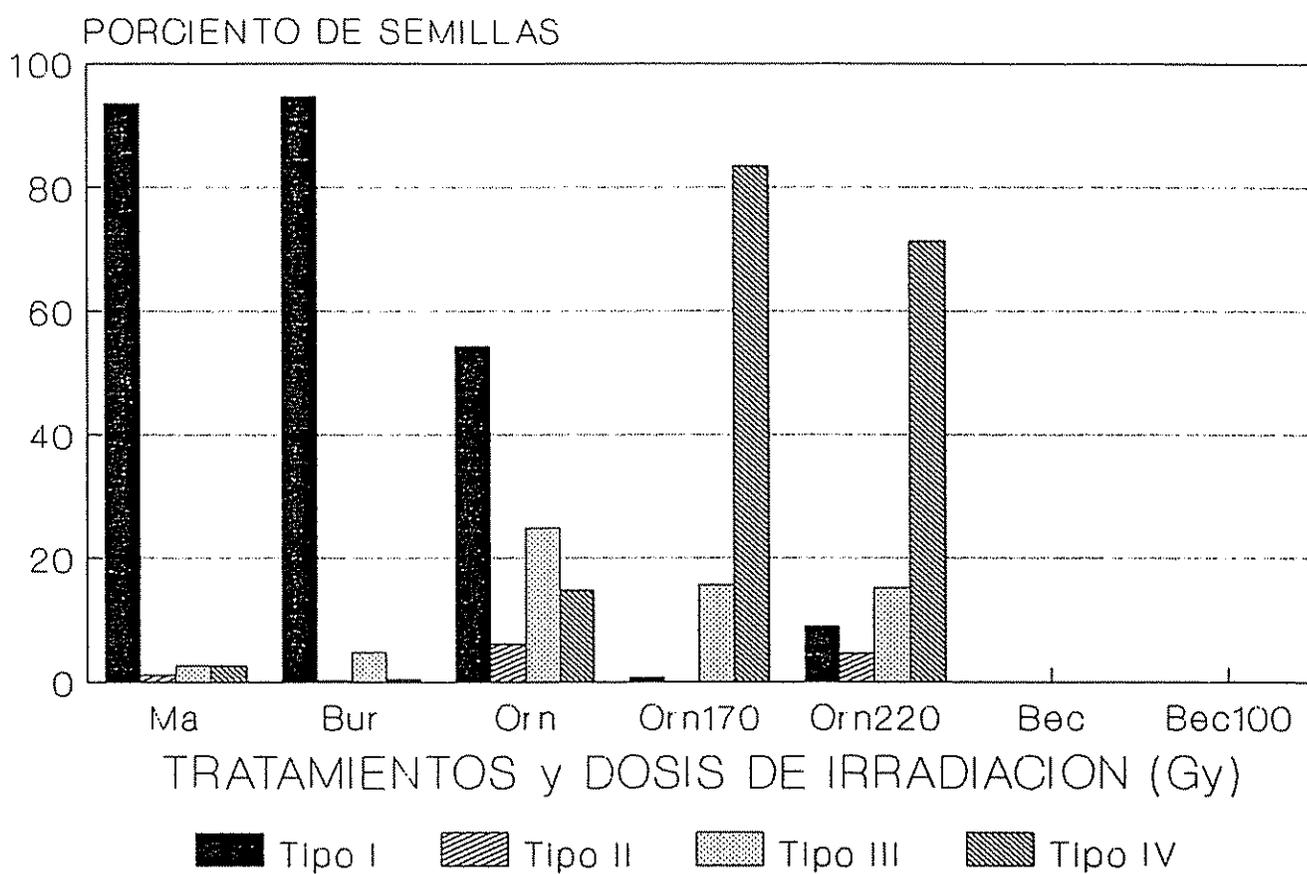


Figura 11. Porcentaje de semillas obtenidas de *Musa acuminata ssp malaccensis* polinizadas con polen de *Musa ornata* y *Musa beccarii*.

4.2 Cantidad de semillas por fruto

4.2.1. Frutos de *burmannicoides*

Los valores del número de semillas promedio por fruto en *burmannicoides* se enlistan en el cuadro 7. Asimismo, se incluye la cantidad de frutos estudiados y el coeficiente de variación.

La cruzada Bur x Bur produce mayor cantidad de semillas por fruto (91) y en Bur x Tani sin irradiación, 72 semillas. En los tratamientos de irradiación al polen se tienen frutos desde 50 semillas (Bur x T90) hasta 72 semillas (Bur x T 220). De lo anterior se deduce que la cantidad de semillas por fruto no es afectada por la dosis o al menos no hay tendencia decreciente al incrementarse la irradiación.

Si consideramos como evento espontáneo el cruce Bur x Bec a 80 Gy; en la hibridación de *burmannicoides* por *beccarii*, conforme aumenta la dosis de irradiación, se afecta la cantidad de semillas encontradas en los frutos. El número de semillas fluctúa de 41 en Bur x Bec hasta 16 en Bur x Bec 150.

En los cruces de *burmannicoides* x *ornata*, hay formación de semillas en un rango de 64 a 79 por cada fruto. Los coeficientes de variación son del 18 a 20% con excepción del cruce Bur x Orn.

Cuadro 7. Cantidad promedio de semillas por fruto en *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*.

Cruza	Frutos estudiados	Semillas/fruto	C.V.
Bur x Bur	24	91	20.78
Bur x Tani	18	72	25.26
Bur x T 70	3	63	9.65
Bur x T 80	9	60	24.33
Bur x T 90	8	50	26.08
Bur x T 100	33	66	32.18
Bur x T 120	15	65	27.32
Bur x T 150	36	69	26.57
Bur x T 170	15	55	38.22
Bur x T 200	29	69	31.98
Bur x T 220	6	72	25.42
Bur x Bec	24	41	36.46
Bur x Bec 70	3	32	24.80
Bur x Bec 80	5	51	64.25
Bur x Bec 90	3	24	38.18
Bur x Bec 150	3	16	40.98
Bur x Orn	27	79	17.86
Bur x Orn 120	9	76	20.23
Bur x Orn 150	3	79	18.64
Bur x Orn 170	3	64	18.94
Bur x Orn 220	3	72	40.66

4.2.2. Frutos de *malaccensis*

Con relación al número de semillas formadas en los frutos de *malaccensis*, en el cuadro 8 se presentan los datos obtenidos.

La cantidad máxima de semillas se obtiene en el cruce intersubespecífico Ma x Bur con 110 semillas; seguido por el intrasubespecífico con 89 semillas. En Ma x Tani sin irradiación se producen 77 semillas en promedio.

La hibridación con polen de Tani irradiado a 100 Gy resultó tener 78 semillas, caso contrario con dosis de 250 Gy solo hubo en promedio de 7 semillas por fruto. Los coeficientes de variación se incrementan conforme aumenta la dosis.

En Ma x Orn produce 81 semillas. Ma x Orn 170 tiene 32 y los frutos de Ma x Orn 220 poseen 47 semillas.

4.3. Rescate de embriones

Ante la imposibilidad de sembrar todos los embriones encontrados en los cruzamientos sin irradiación, solamente se sembraron *in vitro* los primeros 15 embriones encontrados en cada fruto. Por el contrario, se sembraron todos los embriones rescatados de los cruzamientos con irradiación.

Cuadro 8. Cantidad promedio de semillas por fruto de *Musa acuminata ssp. malaccensis*.

Cruza	Frutos observados	Promedio de semillas/fruto	C.V.
Ma x Ma	3	89	2.60
Ma x Bur	12	110	13.61
Ma x Tani	6	77	17.97
Ma x T 60	6	62	21.79
Ma x T 80	9	51	22.00
Ma x T 90	12	64	16.67
Ma x T 100	9	78	20.46
Ma x T 120	3	54	31.31
Ma x T 170	3	33	63.71
Ma x T 220	3	25	49.32
Ma x T 250	3	7	75.03
Ma x T 300	5	12	67.96
Ma x Orn	18	81	23.07
Ma x Orn 170	3	32	29.72
Ma x Orn 220	3	47	14.38

Por lo general todos los embriones de irradiación mostraron menor tamaño y formas irregulares, al compararse con los cruces interespecíficos e intrasubespecíficos sin irradiación. Leblanc (1991) realizó el rescate a los 80 días, contrariamente en este trabajo, se observó que los embriones cigóticos obtenidos con polen irradiado a 100 Gy o dosis superiores, se mueren en los primeros 15 días después de la siembra *in vitro*. Los resultados de germinación son más favorables cuando se rescatan los embriones de semillas tipo I y tipo II, a los 90 días para los tratamientos sin irradiación y a los 120 ó 130 días para aquellos con irradiación. La cantidad de embriones rescatados (sembrados) en todos los cruzamientos en *burmannicoides* se presenta en el cuadro 9 y en *malaccensis* en el cuadro 10, conjuntamente con la germinación de los embriones.

4.4. Germinación de los embriones cigóticos

La germinación de los embriones se consideró a los 15 días después de la observación de tejido verde. Posteriormente se transfirieron a medio MS. Los embriones obtenidos por polinización con polen sin irradiar, por lo general inducen la formación de un callo y después se presenta la embriogénesis, ésta transformación puede ser breve (15-30 días) a muy prolongada (hasta 180 días). También hubo germinaciones rápidas (menos de 15 días), y el embrión germina con el desarrollo de la plúmula.

Cuadro 9. Rescate y germinación de embriones de los cruzamientos interespecíficos en *Musa acuminata ssp. burmannicoides*.

Cruza	Embriones sembrados		Germinación (%)	
	Tipo I	Tipo II	Tipo I	Tipo II
Bur x Bur	360	199	16 (58)	32 (64)
Bur x Tani	79	270	30 (24)	40 (109)
Bur x T 70	2	31	0	58 (18)
Bur x T 80	10	37	10 (1)	65 (24)
Bur x T 90	6	13	100 (6)	38 (5)
Bur x T 100	25	48	36 (9)	37 (18)
Bur x T 120	9	34	78 (7)	12 (4)
Bur x T 150	11	19	0	16 (3)
Bur x T 170	4	2	0	0
Bur x T 200	7	5	0	0
Bur x T 220	0	0	0	0
Bur x Bec	103	155	16 (17)	25 (39)
Bur x Bec 70	0	0	0	0
Bur x Bec 80	5	14	100 (5)	0
Bur x Bec 90	0	0	0	0
Bur x Bec 120	0	0	0	0
Bur x Bec 150	7	4	0	0
Bur x Bec 170	0	0	0	0

() = cantidad de plántulas transferidas al medio MS.

La mayoría de los embriones de polinización con polen irradiado no producen callogénesis-embriogénesis solo germina el embrión mediante la emergencia de la plúmula para posteriormente diferenciarse otros tejidos tales como hojas y raíces.

Después de la germinación de los embriones, aparentemente no se observan diferencias, en condiciones *in vitro*, entre las plantas provenientes de semilla con y sin endospermo, lo cual se debe a que el medio es homogéneo para los embriones de ambos tipos de semillas.

4.4.1. Germinación *in vitro* de los embriones de semillas de burmannicoides.

El comportamiento en la germinación de los embriones de *malaccensis* es irregular. En el cuadro 9 se presentan los porcentajes de germinación obtenidos en todos los cruzamientos efectivos, tanto en semillas tipo I y tipo II. El número de embriones y/o plántulas que pasan al medio de desarrollo se marca entre paréntesis.

No se obtienen plántulas de los cruces con polen de Tani irradiado a 170 Gy, 200 Gy y 220 Gy, así como del cruce con *beccarii* a 70 Gy, 90 Gy, 120 Gy, 150 Gy y 170 Gy. Solamente con los cruces Bur x T 90 y Bur x Bec 80, se logró obtener el 100% de germinación de embriones de semillas tipo I.

Con los cruces Bur x T 70 Gy y Bur x T 150 Gy solo germinan los embriones de las semillas tipo II. La cruza Bur x T 100 Gy presenta iguales proporciones de germinación en embriones de ambos tipos de semilla.

En los cruzamientos de *burmannicoides* por *beccarii* germinan todos los embriones (5) producto de la irradiación al polen con 80 Gy.

4.4.2. Germinación *in vitro* de los embriones de semillas de *malaccensis*.

En el cuadro 10 se enlistan los porcentajes de germinación de embriones tipo I y tipo II. En los cruces Ma x Ma y Ma x Bur, los embriones germinan en un 42 y 41 % respectivamente. Los embriones de semillas tipo II de Ma x Ma no germinaron y en Ma x Bur germinaron los únicos dos rescatados. La combinación de Ma x Tani se observó el 80% de germinación equivalente a 72 plántulas en embriones tipo I, pero solo presentó el 43% en tipo II (20 plántulas).

Con respecto a los cruces con polen Tani irradiado, en embriones de tipo I la germinación fue del 69% (46 plántulas), en Ma x T 80. Con T 60 (25%), T 90 (27%), T 100 (45%), T 120 (26%) y T 170 (25%), obteniendo 35, 22, 30, 6 y 1 plantas, resp.

Cuadro 10. Rescate y germinación de embriones de los cruzamientos interespecíficos en malaccensis.

Cruza	Embriones sembrados		Germinación (%)	
	Tipo I	Tipo II	Tipo I	Tipo II
Ma x Ma	45	3	42 (19)	0
Ma x Bur	180	2	41 (74)	100 (2)
Ma x Tani	90	46	80 (72)	43 (20)
Ma x T 60	151	28	25 (35)	46 (13)
Ma x T 80	67	25	69 (46)	48 (12)
Ma x T 90	81	26	27 (22)	23 (6)
Ma x T 100	69	34	45 (30)	6 (2)
Ma x T 120	23	11	26 (6)	0
Ma x T 170	4	7	25 (1)	0
Ma x T 220	1	0	0	0
Ma x T 250	0	0	0	0
Ma x T 300	0	0	0	0
Ma x Orn	270	87	41 (111)	34 (30)
Ma x Orn 170	1	0	0	0
Ma x Orn 220	12	6	0	0

() = cantidad de plántulas transferidas al medio MS.

En semillas de tipo II las germinaciones fueron las siguientes: 46% (13 plántulas), 48% (12 plántulas), 23% con 6 plántulas y 6% (2 plántulas) en las dosis de 60, 80, 90, y 100Gy. La polinización con ornata produce germinaciones del 41% en embriones de tipo I y 34% en tipo II.

4.5 Densidad estomática

En el cuadro 11 se presentan los promedios de 10 campos ópticos en el haz y envés de las plantas obtenidas en comparación con plantas triploides de los cultivares Corbana-5, Gran enano y Curraré, además del cultivar tetraploide CATIE 24.

Cuadro 11. Densidad estomática promedio de los plantas obtenidas de los cruces ineterespecíficos.

Cruce	Haz	Envés
Bur*Bur	10.60	37.20
Bur*Tani	7.67	38.90
Bur*Bec	10.10	30.40
Ma*Ma	11.00	28.00
Ma*Bur	10.30	39.70
Ma*Tani	9.30	31.80
Ma*Orn	7.42	34.90
Corbana-5	2.50	33.80
Gran enano	4.20	24.60
Curraré	6.10	25.00
CATIE-24	5.30	24.00

Los resultados del cuadro anterior, solamente indican un nivel de ploidía diferente de las plantas obtenidas de los cruces, en comparación con los cultivares triploides y tetraploides.

4.6 Conteos cromosómicos

Todas las observaciones cromosómicas realizadas corresponden a plantas obtenidas por hibridación interespecífica con polen sin irradiación. Las plantas resultantes de la hibridación con polen irradiado no se estudiaron, debido a que todavía no habían alcanzado el crecimiento necesario para transferirse a la fase de adaptación de plantas en el invernadero.

Inicialmente se colectaron muestras de las puntas de raíz a tres diferentes horarios: a las 6:00 A.M., 12:00 m.d. y 6:00 P.M. Resultaron más fáciles de apreciar los cromosomas en el microscopio de aquellas muestras colectadas de 6:00 a 7:00 A.M. Después de esta hora, lo que se observa es una alta frecuencia de células en división pero se dificulta contar los cromosomas.

En todas las plantas obtenidas por cruzamientos, se encuentran números cromosómicos haploides lo cual indica el efecto de hibridación. No se observan células haploides. Sin embargo en caso de doblamiento espontáneo se podría tener plantas homocigotas, razón por la cual fue necesario confirmar mediante electroforesis.

4.7. Electroforesis de isoenzimas

La técnica de electroforesis por isoenzimas, se aplicó a las plantas obtenidas de los embriones cuyas semillas resultaron de la polinización con polen sin irradiación. Las plantas estudiadas corresponden a los cruzamientos de *burmannicoides* por Tani, *burmannicoides* por *beccarii*, *malaccensis* por Tani y *malaccensis* por *ornata*. A continuación se reportan los resultados con los sistemas enzimáticos: peroxidasa (PRX), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (IDH).

4.7.1 *Musa acuminata burmannicoides* por *M. beccarii*

Se estudiaron extractos de plantas obtenidas de este cruce comparativamente con los progenitores, además se agregó una muestra de la planta 37 correspondiente al cruce Bur x Bur. Vease cuadro 12.

4.7.1.1 Peroxidasa (PRX)

Con este sistema enzimático no fué posible identificar las bandas de *beccarii*. Tanto el progenitor *burmannicoides* como la planta 37 (Bur*Bur) presentan tinción de tres bandas, mismas que sirven como comparación.

Al analizar las muestras de esta prueba, se observa que todas las plantas obtenidas (con excepción de la 12-II), tienen una banda

Cuadro 12. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de *burmannicoides* por *beccarii*.

Planta	PRX					MDH						
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7
Bur	1	1	0	1	0	2	0	0	1	1	1	1
Bec	-	-	-	-	-	0	0	1	1	1	0	0
Bur*Bur	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1
21-II	1	1	3	1	0	1	3	1	1	1	1	1
20-II	1	3	3	1	0	1	3	1	1	1	1	1
54-II	3	3	3	1	0	1	3	1	1	1	1	1
9-II	3	0	3	1	0	1	3	1	1	1	1	1
12-II	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1
34-II	1	1	2	1	0	1	3	1	1	1	1	1
29-II	1	1	2	1	0	1	3	1	1	1	1	1
26-II	1	1	2	1	0	1	3	1	1	1	1	1
64-I	1	1	2	1	0	1	3	1	1	1	1	1

- = No tiñe

0 = Ausente

1 = Alta intensidad

2 = Intensidad media

3 = Baja intensidad

en común, probablemente correspondiente a *beccarii*, puesto que no se presenta en Bur ni en Bur*Bur. De ser así, todas las plantas son híbridas puesto que presentan las bandas PRX-3 y PRX-4. Dichas plantas tienen las bandas PRX-1 y PRX-2 en común.

La planta 12 solo presenta la banda PRX-4 característica de *burmannicoides* y una banda adicional (PRX-5) localizada hacia la parte más negativa del gel. Esto la hace diferente al resto de las plantas evaluadas.

4.7.1.2 Malato deshidrogenasa (MDH)

En la planta 12-II, se observa solo una mancha indefinida en este sistema enzimático, desplazada más hacia el polo positivo del gel y desplazada a partir de la banda MDH-7.

Las plantas de *burmannicoides* presentan cinco bandas características; tres de ellas equidistantes hacia la parte central del gel (MDH-4, MDH-5 y MDH-6) y una a cada lado de ellas (MDH-1 y MDH-7).

Las tres muestras de *beccarii* se caracterizan por la presencia de tres bandas equidistantes, dos de las cuales (4 y 5) están al mismo nivel de *burmannicoides* y una desplazada hacia el origen de corrimiento de las muestras (MDH-3). Esta última es distintiva de *beccarii* y aparece en todas las plantas provenientes de esta cruce.

La adición de las cinco bandas de *burmannicoides* y la banda diferencial de *beccarii* corresponden a un claro efecto de hibridación de los genotipos descendientes.

4.7.1.3 Isocitrato deshidrogenasa (IDH)

En este sistema enzimático la tinción de las bandas es muy tenue para las plantas descendientes. Sin embargo, en los padres la tinción es aceptable.

En *beccarii* se observan tres pares de bandas equidistantes entre sí que contrastan notoriamente con las de *burmannicoides*. Aparentemente hay un efecto de hibridación para este sistema enzimático.

4.7.2 *Musa acuminata burmannicoides* por *M. balbisiana* Tani

Se estudiaron ambos progenitores junto con los extractos de las plantas 11, 39, 6, 62, 71, 69 y 58 descendientes de origen Tipo I y las plantas 27, 45 y 74 son de tipo II. Para la comparación con plantas de origen intrasubespecífico se sumaron a la lista las plantas 24 y 32. Vease cuadro 13.

4.7.2.1 Peroxidasa

En *balbisiana* tipo Tani aparecen solamente dos bandas (PRX-1

Cuadro 13. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de *burmannicoides* por *balbisiana* tipo Tani.

Planta	PRX				MDH							
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8
Bur	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
Tani	1	1	0	0	0	2	1	1	1	1	3	0
11-II	1	1	0	1	3	3	2	2	2	0	3	3
39-II	1	2	0	1	3	3	2	2	2	0	3	3
6-II	1	2	0	1	3	3	2	2	2	0	3	3
62-II	1	0	0	1	3	3	1	1	1	0	2	1
27-II	1	2	0	2	3	0	1	1	1	0	0	1
Bur*Bur	1	2	0	2	3	0	1	1	1	0	0	1
Bur*Bur	1	2	0	2	3	0	1	1	1	3	2	1
71-II	1	1	0	1	3	3	1	1	1	3	2	1
45-I	1	1	0	1	3	3	1	1	1	3	2	1
69-II	1	1	0	1	3	3	1	1	1	3	2	1
58-II	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	2	1
74-I	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	2	1

0 = Ausente

1 = Alta intensidad

2 = Intensidad media

3 = Baja intensidad

y PRX-2) que están al mismo nivel con las de *burmannicoides*. Todas las plantas estudiadas tienen la banda PRX-3 de *burmannicoides*. La planta 62-II es la única en que la banda PRX-2 está ausente. Con este sistema enzimático se dificultó la identificación de los genotipos.

4.7.2.2 Malato deshidrogenasa

En *Musa Balbisiana* tipo Tani hay tres bandas equidistantes al mismo nivel de *burmannicoides* (MDH-3, MDH-4 y MDH-5); sin embargo, la banda que caracteriza a Tani, es MDH-6 que se observa en las plantas 71, 45, 69, 58 y 74. La banda MDH-7 también es distintiva de Tani, con tinción regular en las plantas 11, 39, 6 y 62. Las plantas obtenidas de esta cruce presentan claramente las bandas 3, 4, 5 y 8 de *burmannicoides* y la banda MDH-1 tiñe pero es muy leve.

Los resultados de este sistema enzimático manifiestan un bandeo híbrido por la comparación de ambos progenitores.

4.7.2.3 Isocitrato deshidrogenasa.

Los resultados no fueron muy satisfactorios, puesto que la tinción fué deficiente en este sistema enzimático.

4.7.3 *Musa acuminata malaccensis* por *M. balbisiana* Tani

Para estudiar esta cruce solamente se utilizaron las plantas 46, 55 y 4 con origen de tipo I; en virtud del escaso desarrollo de las plantas obtenidas. Las progenies de *malaccensis* x *tani* y *malaccensis* por *ornata* se estudiaron en el mismo gel. Cuadro 14.

4.7.3.1 Peroxidasa (PRX)

En la subespecie *malaccensis* se presentan las bandas PRX-2 y PRX-4, mismas que tiñen intensamente. Las bandas de *Musa balbisiana* tipo Tani están más unidas y su tinción es leve (PRX-1 y PRX-3).

Las plantas estudiadas presentan la banda PRX-5 y además una banda (PRX-6) hacia la parte más negativa, que no aparece en ninguno de los padres, pero si en el cruce Ma*Ma.

4.7.3.2 Malato deshidrogenasa

En MDH las bandas MDH-3, MDH-4 y MDH-5 se observan en padres e hijos. La banda MDH-2 y MDH-9 están presentes en *malaccensis* y en los descendientes. Por otro lado la banda MDH-6 aparecen en Tani y en la descendencia. La MDH-8 está en el cruce Ma*Ma y en las plantas estudiadas. Por lo anterior, los cruces de Ma*Tani no manifiestan la hibridación, solo hay características maternas.

Cuadro 14. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de *malaccensis* por *balbisiana* tipo Tani.

Planta	PRX						MDH								
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ma	0	1	0	1	0	0	3	3	1	1	1	0	0	0	1
Ma*Ma	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	1	0	0	1	1
Tani	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
46-I	0	0	0	0	1	1	0	3	1	1	1	1	0	1	1
55-I	0	0	0	0	1	1	0	3	1	1	1	1	0	1	1
4-I	0	0	0	0	3	1	0	3	1	1	1	1	0	1	1

0 = Ausente

1 = Alta intensidad

2 = Intensidad media

3 = Baja intensidad

La hibridación de Ma x Ma representada por la planta 86, tiene solo las bandas MDH-3, MDH-4, MDH-5, MDH-8 y MDH-9. Sin embargo, la MDH-8 característica adicional en este cruce también se observa en las plantas 4, 46 y 55.

Lo anterior manifiesta un efecto de hibridación. No obstante, es importante evaluar la F1 y F2 para conocer el comportamiento y comprobar si ésto conduce a obtener líneas puras en un corto plazo.

4.7.3.3 Isocitrato deshidrogenasa

En este sistema, no se precisó el bandeo en las plantas producidas por la hibridación. Solamente se distinguen los genotipos progenitores.

4.7.4. *Musa acuminata malaccensis* por *M. ornata*

Las plantas estudiadas con origen tipo I son codificadas con los números 22, 15, 56, 23, 35 y 7; y de origen tipo II solo la planta 31. Vease cuadro 15.

4.7.4.1 Peroxidasas

En este sistema enzimático no se observó el bandeo de *ornata*. Todas las plantas presentan la banda PRX-3 y PRX-4, no así la banda PRX-2 que solo está presente en las plantas 22, 31, 23 y

Cuadro 15. Representación de las bandas de PRX y MDH observadas en el cruce de *malaccensis* por *ornata*.

Planta	PRX						MDH								
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ma	1	0	1	0	0	0	3	3	1	1	1	0	0	0	1
Ma*Ma	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	1	1
Orn	-	-	-	-	-	-	0	0	1	1	1	1	0	0	0
22-I	0	2	1	2	0	0	3	3	1	1	1	1	0	1	1
15-I	0	0	1	2	0	3	3	3	1	1	1	1	0	1	1
31-II	0	1	1	2	3	0	3	3	1	1	1	1	0	1	1
56-I	0	0	1	2	0	0	3	3	1	1	1	1	0	1	1
23-I	0	1	1	2	0	0	3	3	1	1	1	1	0	1	1
35-I	0	0	1	2	3	0	3	3	1	1	1	1	0	1	1
7-I	0	1	1	2	3	0	3	3	1	1	1	1	0	1	1

- = No tiñe

0 = Ausente

1 = Alta intensidad

2 = Intensidad media

3 = Baja intensidad

7. En las plantas 31, 35 y 7 está la banda PRX-5 que es muy tenue. La banda PRX-6 es característica de la planta 15.

4.7.4.2 Malato deshidrogenasa

Los padres *malaccensis* y *ornata* presentan tres bandas al mismo nivel que son MDH-3, MDH-4 y MDH-5. En esta prueba se distinguen ambos padres, puesto que *malaccensis* posee la banda MDH-9 y *ornata* la banda MDH-6. Al comparar la tinción de los descendientes se observa que todas las plantas estudiadas tienen las bandas distintivas de *malaccensis* y *ornata*. Asimismo, está presente la banda MDH-8 característica del cruce intrasubespecífico (planta 86).

4.7.4.3 Isocitrato deshidrogenasa

De igual forma también no fué posible revelar claramente las bandas en las plantas estudiadas. En *ornata* se observan tres pares de bandas equidistantes entre sí y en *malaccensis* cinco bandas teñidas irregularmente.

5. DISCUSION

A continuación se discuten los resultados del presente trabajo en cada una de las variables estudiadas. Los embriones rescatados de los cruzamientos con polen irradiado mostraron latencia en la germinación y escaso crecimiento. Por tal motivo, en esta investigación, solamente se toman en cuenta las plantas que fueron obtenidas por polinización con polen sin irradiación y posteriormente se publicará un artículo complementario con la evaluación de las plantas originadas por polinización con polen irradiado.

5.1 Identificación de semillas

Los híbridos intrasubespecíficos e interespecíficos se consideraron como testigos comparativos.

El cruce *burmannicoides* por *burmannicoides* produce un alto porcentaje de semillas tipo I (72.17) y un 9% de semillas tipo II. Contrariamente, el cruce interespecífico *burmannicoides* (AA) por *balbisiana* tipo Tani (BB) solo produce un 6% de semillas tipo I y un 30% de semillas de tipo II. El porcentaje de semillas tipo I coincide con el grado de fertilidad del polen de *M. acuminata* reportado por Agarwal (1988). Si se consideran los porcentajes de semillas tipo I como el grado de fertilidad, se puede decir que la

hibridación de *acuminata* por *balbisiana* no ha creado, a través del tiempo, la suficiente variabilidad genética, a pesar de su origen sexual, debido a que las semillas normales o viables (tipo I, con embrión y endospermo) se producen en una proporción baja, y son éstas las únicas capaces de germinar en condiciones naturales.

El cruce *malaccensis* por *malaccensis* produce un 94% de fertilidad en las semillas (tipo I), es decir el 22% mas fértil con relación al cruce intrasubespecífico de Bur x Bur y el 1.16% del tipo II. Con el cruce de *malaccensis* por *balbisiana* Tani se reduce la fertilidad al 68%. De lo anterior se deduce que el cruce interespecífico usando *malaccensis* como hembra, la fertilidad es mayor con respecto a *burmannicoides*.

La radiación de 220 Gy es letal para el polen de *balbisiana* usado sobre *burmannicoides*. A esta dosis en *malaccensis* solo se observa el 0.90 % de semillas tipo I y para 250 Gy no se encuentran semillas de tipo I y II.

El tratamiento de irradiación al polen de Tani en *malaccensis*, donde se obtienen mas semillas tipo II (con embrión y sin endospermo), corresponde a la dosis de 60 y 120 Gy con un porcentaje de 7.89 y 7.42, repectivamente.

De acuerdo con Vassileva-Dryanovska (1966a), con dosis altas se espera mayor desorganización de la cromatina en los nucleos del

polen; cuando la desorganización es en forma densa, se puede estimular al núcleo femenino (óosfera) o bien dividirse sin tener que fusionarse. Según el grado de anormalidades en la cromatina el proceso de fertilización puede ser doble o simple (1966b). Por lo tanto se espera que aumente la probabilidad de los embriones cigóticos de origen partenogenético. Las frecuencias de las mutaciones son bajas, y se requiere un mayor tamaño de muestras para detectar los embriones formados. Los resultados obtenidos, de semilla tipo I y tipo II, se explican considerando a Nicoll *et al.* (1987), quién reporta alteraciones de la doble fecundación, y por ende el desarrollo e interacciones del embrión y endospermo.

En *burmannicoides* la producción de semillas tipo III no es afectada por la irradiación al polen y en tipo IV se incrementan conforme aumenta la dosis. En *malaccensis* la producción de semillas tipo III y IV no tiene un patrón definido. De acuerdo con Vassileva-Dryenovska (1966b), con exposiciones bajas el endospermo se forma con fuertes anormalidades.

En *burmannicoides*, la polinización con especies ornamentales sin irradiación produce embriones de los cuatro tipos. En *malaccensis* no hay hibridación con *beccarii*, por una probable incompatibilidad en el tubo polínico y, con *ornata* se producen los cuatro tipos de semillas. Cabe mencionar al respecto, que son de interés aquellos embriones obtenidos de las cruces de *burmannicoides* (n=11) por *beccarii* (n=9), debido a su diferencia en

números cromosómicos, condición en la cual es posible esperar irregularidades en la meiosis. El cruce de *malaccensis* x *ornata* también es de interés, pues Simmonds (1962) reportó que se obtuvieron 8 diploides, 4 triploides y 135 pentaploides.

Los resultados obtenidos de la polinización con polen de las especies ornamentales, coinciden parcialmente con los reportados por Simmonds (1962), quien menciona una fertilidad del 49.7 % en los cruces de *acuminata* por *ornata*, pero cuando se usa el clon Calcuta 4 se producen pocos híbridos con semillas muy raquílicas. En este trabajo se observó que cuando se usa la subespecie *malaccensis* como madre se logra una fertilidad del 54% y solo 2% cuando la madre es *burmannicoides* (Calcuta 4), con semillas muy raquílicas de color amarillento.

Si hay compatibilidad, la irradiación del polen de las especies *beccarii* y *ornata* puede producir espontáneamente semillas tipo I y II y deben ser motivo de estudio.

5.2 Cantidad de semillas por fruto

El conteo de semillas totales formadas por fruto se hizo como complemento a la identificación de las semillas.

En la subespecie *burmannicoides* la cantidad de semillas no se ve afectada por la dosis de irradiación al polen de *balbisiana* Tani

o al menos, no hay tendencia decreciente al aumentar la dosis. Al usar el polen de *beccarii* la relación es inversa, con excepción del cruce Bur x Bec 80 Gy que producen más semillas. Con el polen de *ornata* la producción de semillas no se altera en las diversas dosis.

En *malaccensis* las semillas por fruto son irregulares. Tal irregularidad es proporcional al coeficiente de variación de los resultados. Nicoll et al. (1987), considera que los rayos gamma tienen efectos en el número de semillas y tamaño de la fruta, puesto que con las dosis de irradiación al polen, se generaliza toda o ninguna respuesta en el saco embrionario. Dicha respuesta explica la variabilidad de los resultados.

5.3 Rescate de embriones

En *burmannicoides* por Tani se rescataron embriones desde las dosis de 70 Gy hasta 200 Gy, tanto en semillas tipo I y II. El uso de polen de *beccarii* sin irradiar produce ambos tipos de semillas. Con irradiación al polen solo se observan embriones en las dosis de 80 Gy y 150 Gy.

En *malaccensis* por *balbisiana* Tani se logran producir embriones irradiando el polen desde 60 Gy hasta 170 Gy en ambos tipos de semillas. Con 220 Gy se rescató un embrión tipo I. Con la utilización del polen de *ornata* se producen embriones tipo I y II.

Por lo tanto, es factible obtener embriones en *malaccensis* polinizados a 170 Gy y 220 Gy.

Cuando se usó polen de *balbisiana* tipo Tani, Leblanc (1991) reportó la obtención de embriones hasta un intervalo de 10 Kr (100 Gy). Los resultados obtenidos indican que la dosis de irradiación se puede ampliar; pero ello exige un seguimiento detallado para detectar los pocos embriones que se logran formar. La edad para el rescate de los embriones maduros a los 80 días, que reporta el mencionado autor y Escalant y Teisson (1987), se aumentó a 90 días para los embriones originados sin irradiación y a 120 días con irradiación. De igual forma Zhang y Lespinasse (1991), extrajeron embriones inmaduros de manzana a una edad de 60 a 90 días después de la polinización.

5.4 Germinación de embriones cigóticos.

En *burmannicoides* la germinación de los embriones cigóticos es muy variable. Con base en los resultados, las dosis de T 170 Gy, T 200 Gy y T 220 Gy son letales para los embriones tipo I y II. Al usar el polen de *beccarii* germinaron solamente los cinco embriones tipo I obtenidos por cruzamiento con 80 Gy. Con excepción de esta dosis, la polinización con polen irradiado condiciona a la muerte de los embriones.

En *malaccensis* hay germinación de embriones cruzados por Tani hasta 170 Gy en tipo I y hasta 100 Gy en los tipo II. En la hibridación normal de *malaccensis* por *ornata* es posible obtener embriones cigóticos de ambos tipos y germinar. Con el polen irradiado de *ornata* no hay germinación y por tanto el efecto de la irradiación es letal para el polen de *ornata*.

La mayoría de los embriones obtenidos con irradiación al polen no germinaron. Estos resultados coinciden con el reporte de Zhang y Lespinasse (1991), donde mencionan que la mayoría de los embriones de irradiación no fueron viables o murieron poco después y se detectaron plantas haploides partenogénicas en dosis bajas (200-500 Gy).

5.5 Obtención de plantas.

Las plantas producidas por hibridación con polen irradiado mostraron un crecimiento lento y se encuentran aun en la fase de desarrollo *in vitro*. Dichas plantas serán motivo de un análisis posterior. Las plantas provenientes de los cruzamientos con polen sin irradiar por lo general tienen crecimiento rápido.

Los resultados comparativos entre el rescate, la germinación y la obtención de plantas indican una baja recuperación de plantas. La fase de germinación es crítica, por lo que es recomendable evaluar diferentes medios de cultivo con el fin de lograr la germinación de la mayor cantidad de embriones.

Al respecto, varios autores reportan la obtención de plantas polinizadas con polen irradiado (Virk *et al.*, 1977; Pandey, 1980; Pandey y Phung, 1982; Nicoll *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1988; Pandey *et al.*, 1990; Zhang y Lespinasse, 1991 y Leblanc, 1991), aunque por el contrario Sanford *et al.*, (1984), concluye que la inducción de la transformación de la célula huevo no se presenta en *Lycopersicon esculentum* o bien puede limitarse a otras especies.

5.6 Densidad estomática

La densidad estomática se realizó con el fin de adoptar una prueba rápida de identificación de las plantas obtenidas. Para ello, se consideró el reporte de Couturon (1986). Las plantas estudiadas poseen más densidad estomática en comparación con tres testigos triploides y un tetraploide, ubicando a dichas plantas dentro de un nivel de ploidía inferior.

5.6 Conteos cromosómicos.

Las observaciones de cromosomas se hicieron con la finalidad de identificar el grado de ploidía (haploides), en estados tempranos del desarrollo de las plantas. En todas las plantas se observaron juegos cromosómicos diploides y no se observaron juegos cromosómicos haploides en las plantas estudiadas polinizadas con polen sin irradiar. Lo anteriormente expuesto, hace suponer que se presentan hibridaciones de los genotipos progenitores, aunque

también pudo haber haploides en su inicio, y los cuales se duplican espontáneamente, por lo que el comportamiento en número cromosómico (en mitosis) es igual a los diploides normales, pero en condición homocigota para todas las características. Para confirmar el grado de homocigosis o heterocigosis es necesario realizar pruebas rápidas para conocer el genotipo de las plantas sin tener que esperar a la etapa reproductiva.

5.7 Electroforesis de isoenzimas

El sistema enzimático peroxidasa (PRX), inicialmente brinda una idea del comportamiento de los genotipos estudiados. Es una prueba fácil y rápida pero debe ser estudiada inmediatamente debido a la oxidación. Los genotipos *ornata* y *beccarii* no tiñen con PRX.

En malato deshidrogenasa (MDH), se identifican claramente todos los genotipos estudiados, razón por la cual se consideró el mejor sistema evaluado. Las plantas híbridas presentan mas bandas de los progenitores femeninos.

Con isocitrato deshidrogenasa (IDH) es posible caracterizar a los padres, pero con las plantas F_1 la tinción no es definida. Es probable que este sistema requiera más edad de la planta o bien probar diferentes concentraciones de las soluciones reveladoras.

Con base en los resultados, todas las plantas descendientes muestran bandas características de ambos progenitores y se confirma un efecto de hibridación, aunque algunas poseen mas características maternas, tal es el caso de la planta 12-II de *burmannicoides* por *beccarii* y la planta 27-II de *burmannicoides* por Tani.

6. CONCLUSIONES

1. Las dosis de irradiación al polen de *Musa balbisiana* tipo Tani que producen mayor número de semillas con embrión y sin endospermo (tipo II) son: en *burmannicoides* a 70 Gy (16.44%) y en *malaccensis* a 60 Gy (7.89%) y a 120 Gy (7.42%).
2. Los cruzamientos interespecíficos con las especies ornamentales *Musa beccarii* y *Musa ornata* son factibles para obtener semillas tipo I y tipo II.
3. En la cruce de *burmannicoides* por *ornata*, la fertilidad es muy baja (2%) y el cruce *malaccensis* por *beccarii* no forma frutos.
4. Se obtienen plantas usando el polen irradiado de *Musa balbisiana* tipo Tani en los cruzamientos son:
 - a) *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* con las dosis de 70 Gy, 80 Gy, 90 Gy y 100 Gy.
 - b) *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* se logran plantas con dosis de 60 Gy, 80 Gy, 90 Gy y 100 Gy.Con mayores dosis los embriones o plántulas mueren.

5. Todas las plantas tipo I y II obtenidas por polinización sin irradiación resultaron ser híbridas en la prueba de electroforesis por isoenzimas. No se observaron genotipos homocigotos; por lo tanto no hay inducción de partenogénesis en las plantas de la F_1 .
6. En los cruzamientos de *malaccensis* se observa en MDH una banda característica del cruce intrasubespecífico, que es importante evaluar en la F_2 .
7. La fase crítica de esta metodología es en la germinación de los embriones cigóticos.

7. RECOMENDACIONES

1. Analizar las plantas obtenidas por irradiación del polen, por ser más promisorias para los objetivos de esta investigación.
2. Usar preferentemente a *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* para los futuros trabajos debido a su mayor fertilidad.
3. Evaluar diferentes medios de cultivo para lograr una mayor germinación de los embriones cigóticos obtenidos por polinización con polen irradiado
4. Inducir la duplicación cromosómica en etapas iniciales del crecimiento de la planta, a fin de asegurar la sobrevivencia de posibles haploides.
5. Usar isoenzimas como marcadores genéticos, para realizar una mejor identificación de los genotipos obtenidos.

7. LITERATURA CITADA

- ABDALLA, M.M.F.; HERMSEN, J.G. Th. 1972. Diploid parthenogenesis and androgenesis in diploid *Solanum*. *Euphytica* 21:426-431.
- AGARWAL, P.K. 1988. Cytogenetical investigations in Musaceae IV. Cytomorphology of an interespecific triploid hybrid of *Musa acuminata* Colla x *M. rubra* Wall. *Cytologia* (Japón) 53(4):717-721.
- ARGENT, G.C.G. 1976. The Wild bananas of Papua New-Guinea. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinb.*, 35:77-114.
- ASKER, S. 1979. Progress in apomixis research. *Hereditas* 91:231-240.
- ASKER, S. 1980. Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas* 93:277-293.
- BELALCAZAR, C.S. 1991. El cultivo del plátano en el trópico INIBAP-ICA-CIID-Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Impresora Feriva Ltda. Cali, Colombia. 369-p.
- BORGES, F.O. 1977. Los recursos genéticos en *Musa* y el mejoramiento para resistencia a enfermedades. In *Proceedings of a symposium*, Austria, Viena. 1977. ref:UP4513.
- CHAMPION, J. 1968. El plátano. Trad. Fermín Palenque, Barcelona, Editorial Blume. 247 p.
- CIRAD. 1989. Manuel pratique d'histologie végétale. Laboratoire de cytogénétique et d'histologie végétale. Montpellier, Francia. 61 p.
- COUTURON, E. 1986. Le tri précoce des haploïdes d'origine spontanée de *Coffea canephora* Pierre. *Café Cacao Thé* (Paris) 30(3):171-176.

- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. Plant cell Reports (EE.UU.) 7(1):23-25.
- DE LANGHE, E. 1987. Necesidad de una estrategia internacional para el mejoramiento genético del banano y plátano. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 4:17-31.
- EENINK, A.H. 1974. Matromorphy in *Brassica oleracea* L. I. Terminology, parthenogenesis in cruciferae and the formation and usability of matromorphic plants. *Emphytica* 23:429-433.
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1987. Comportements *in vitro* de L'embryon isolé du bananier (*Musa species*). *Fruits (francia)* 42(6):333-342.
- 1989. Somatic embryogenesis and plants from inmadure zygotic embryo of the species *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. *Plant cell reports (EE.UU)* 7:665-668.
- ESPINO, R.R.; PIMENTEL, R.B. 1988. Electrophoretic analysis of selected isozymes in BB cultivars of Philippine bananas. In R.L. Jarret (Ed). Proceedings of an international workshop held at Los Baños, Philippines. 5-10 september 1988. INIBAP. p 36-40.
- FLORES, V.E.M. 1989. La planta: estructura y función. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 504 p.
- GANRY, J. 1990. The main problems at international level. *Fruits-special bananes (Francia)* p 12-16.
- HANG, A.; BREGITZER, P. 1993. Chromosomal variations in immature embryo-derived callifrom six barley cultivars. *The Journal of Heredity* 84(2):105-108.
- HORRY, J.P. 1989. Chimiotaxonomic et organisation genetique dans le genre *Musa*. *Fruits (Francia)* 10(44): 509-520.

- JARRET, R.L. 1987. Isozymes and allelic diversity in the Genus *Musa*. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 70:20-23.
- JARRET, R.L.; LITZ, R.E. 1986a. Enzyme polymorphism in *Musa acuminata* Colla. The Journal of Heredity 77:183-188.
- JARRET, R.L.; LITZ, R.E. 1986b. Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. Euphytica (Holanda) 35:539-549.
- LACADENA, J.R. 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. In Haploids in higher plants. Proceedings of a international symposium, Guelph, Ontario, Canada, 1974. Edited by K.J. Kasha. Guelph, Ontario University of Guelph. p 13-32.
- LANAUD, C.; TEZENAS, H.; JOLIVOT, M. P.; GLASZMAN, J.C.; GONZALEZ DE LEON, D. 1992. Variation of ribosomal gene spacer length among wild and cultivated banana. The Journal of Heredity 68:147-156.
- LEBLANC UREÑA, H.A. 1991. Partenogenesis inducida en *Musa* ssp. para la obtención de plantas haploides. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 120 p.
- LEBRUN, P.; CHEVALLIER, M.H. 1989. Starch and polyacrylamide gel electrophoresis of *Hevea brasiliensis* a laboratory manual. IRCA/CIRAD. 55 p.
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue on to genetic and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. 45:753-763.
- MARSHALL, D.R.; BROWN, A.D.H. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In O.H. Frankel y J.D.Hawkes (eds.). Crop Genetic Recources for today and tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge.
- McGAHAM, M. W. 1961. Studies on the seed of banana. 1. Anatomy of the seed and embryo of *Musa Balbisiana*. American Journal of Botany (EE.UU.). 48:230-237.

- MONTGOMERY, M.W.; SGARBIERI, V.C. 1975. Isoenzymes of banana polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 14:1245-1249.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 15:473-479.
- NICOLL, M.F.; CHAPMAN, G.P.; JAMES, D.J. 1987. Endosperm responses to irradiated pollen in apples. *Theoretical and Applied Genetics (EE.UU)* 74:508-515.
- NISHIYAMA, I.; YABUNO, T. 1978. Causal relationships between the polar nuclei in double fertilization and interespecific cross-incompatibility in avena. *Cytología (Japón)* 43(2):453-466.
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; DUREN, M.VAN; OMAR, M.S. 1990 Mutation induction by gamma irradiation of in vitro cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa cvs*). *Tropical Agriculture (Trinidad)* 67(1):21-28.
- PANDEY, K.K. 1974. Overcoming interespecific pollen incompatibility through the use of ionising radiation. *Heredity* 33(2):279-284.
- PANDEY, K.K.; PHUNG, M. 1982. "Hertwing effect" in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics (EE.UU)* 62(4):295-300.
- PANDEY, K.K.; PRZYWARA, L.; SANDERS, P.M. 1990. Induced Parthenogenesis in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. *Euphytica (Holanda)* 51:1-9.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. *Technique et Documentation (Lavoisier)*. Paris, Francia. 217 p.
- POEHLMAN, J.M. 1983. Mejoramiento genético de las cosechas. Trad. N. Sánchez, México, Editorial Limusa. 453 p.

- QUIROZ, C.F. 1991. Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos. *In* W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 857-876.
- RAMIREZ, H.; CALDERON, A.; ROCA, W.M. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. *In* W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. 825-855.
- RICK, C.M. 1983. Tomato. *In* S.D. Tanksley y T.J. Orton (Rds). Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsevier, Amsterdam, Holanda. 147-165 p.
- SANFORD, J. C.; CHYI, Y.S.; REISCH, B. I. 1984. An attempt to induce "Egg transformation" in *Lycopersicum esculentum* Mill. using irradiated pollen. *Theoretical and applied Genetics* (EE.UU.) 67(6):553-558.
- SHEPHERD, K. 1986. Mejoramiento genético del banano. *In* UPEB (Ed.). Mejoramiento genético de banano y plátano en Brasil y Honduras. Panamá. p.1-19.
- 1987. Banana breeding-Post and present. *Acta Horticulturae*. (Países Bajos) 196:37-43. Ref:UP4434.
- SIDOROVA, N.; MORGUN, V.; LOGVINENKO, V.; KARPETS, A. 1990. Effect of gamma radiation on inmadure winter wheat embryo culture. *Mutation breeding Newsletter* 35.p.12.
- SIMMONDS, N.W. 1962. The evolution of bananas. New York. J. Wiley.170p.
- 1973. Los plátanos. Editorial Blume. Barcelona. 539 p.
- SOTO, B.M. 1990. Bananos: cultivo y comercialización. 2a. Ed. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta Lil. 627 p.

- STOVER, R.H.: BUDDENHAGEN, I.W. 1986. Fitomejoramiento del banano, poliploidía, resistencia a enfermedades y productividad. In mejoramiento genético de banano y plátano en Brazil y Honduras. Panamá, UPEB. p.20-25.
- STRICKBERGER, M.W. 1974. Genética. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. 880 p.
- SUTTON, B.; HARMON, P. 1971. Fundamentos de Ecología. Serie instrucción programada. LIMUSA. México-293p.
- VASSILEVA-DRYANOVSKA, O.A. 1966a. Development of embryo and endosperm produced after irradiation of pollen in *Tradescantia*. Hereditas 55(9):129-147.
- . 1966b. The induction of haploid embryos and tetraploid endosperm nuclei with irradiated pollen in *Lilium*. Hereditas 55(11):160-165.
- VIRK, D.S.; DHAHI, S.J.; BRUMPTON, R.H. 1977. Matromorphy in *Nicotiana rustica*. Hereditas 39(2):287-295.
- VUYLSTEKE, D.R.; SWENEN, R.L.; ORTIZ, R. 1993. Development and performance of black Sigatoka-resistant tetraploid hybrids of platain *Musa* spp., AAB group). Euphytica (Holanda) 65:33-42.
- ZHANG, Y.K.; LESPINASSE, Y.; CHEVREAU, E. 1988 Obtention de plantes haploides de Pommier (*Malus x domestica* Borkh.) issues de parthenogenese induite *in situ* par du pollen irradié et culture *in vitro* des pépins. C.R. Acad. Sci. Paris 307-III:451-457.
- ZHANG, Y.X. 1988. Recherche *in vitro* de plantes haploides chez le pommier cultivate (*Malus x Domestica* Borkh.): Androgenese, gynogenese, parthenogenese *in situ* induite par du pollen irradié. Tesis Ph.D. Orsay, Francia, Universite de Paris. 112 p.
- ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. Euphytica (Holanda) 54:101-109.

ANEXOS

ANEXO 1

Medio de Murashige y Skoog, 1962.

Producto	cantidad (mg.l ⁻¹)
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1650.000
Acido bórico (H ₃ BO ₃)	6.300
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440.000
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.025
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.800
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370.000
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .H ₂ O)	16.900
Ioduro de potasio (KI)	0.830
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900.000
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	190.000
Sal sódica de etilen dinitril tetracetato (Na ₂ .EDTA)	37.300
Molibdato de sodio (MoNa ₂ O ₄)	0.250
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8.600

ANEXO 2

Solución extractora.

Producto	cantidad
P 0.25 M pH 7.4 *	20.00 ml
Acido ascórbico (sal de sodio)	0.10 g
Cisteina	0.24 g
Triton 10% **	1.50 ml
Agua destilada	aforar a 1000.00 ml

* P 0.25 M pH 7.4:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71.8 g
KH_2PO_4	6.8 g
H_2O	aforar a 1000.0 ml

** Triton 10%:

Triton x.100	10.0 ml
H_2O	aforar a 100.0 ml

ANEXO 3

Procedimiento para la preparación del gel de almidón.

-
- Pesar 50 g de almidón y vaciar en un matríz kitasato.
 - Preparar solución Tris Citrato pH 7.0 a una dilución de 20X, de acuerdo con las dimensiones de la placa se usan 20 ml de la solución Tris Citrato pH 7.0 para después aforar con agua destilada a 400 ml para adicionar al almidón.
 - Colocar la placa sobre una superficie nivelada.
 - Agitar y calentar hasta observar el inicio de ebullición por un tiempo aproximado de 15 minutos.
 - Aplicar vacío inmediatamente para eliminar las burbujas que se forman durante el calentamiento.
 - Vaciar la solución sobre la placa que previamente debe ser sellada con cinta adhesiva en los canales laterales.
 - Si se observan algunas burbujas en el gel, éstas deben eliminarse rápidamente. De no ser así, es recomendable preparar otro gel.
 - Esperar la solidificación del gel, la conservación puede ser a temperatura ambiente, dentro de una bolsa de plástico a fin de evitar resecamiento.
 - Al utilizarse se debe refrigerar (4⁰C) durante 30 minutos.
-

ANEXO 4

Preparación de las soluciones amortiguadoras.

Tris Citrato pH 7.0 (TC7):

Tris	16.35 g/p
Acido cítrico	9.04 g/p
pH= 7.0	

Tris HCl 0.2 M pH 8.0 (Tris A):

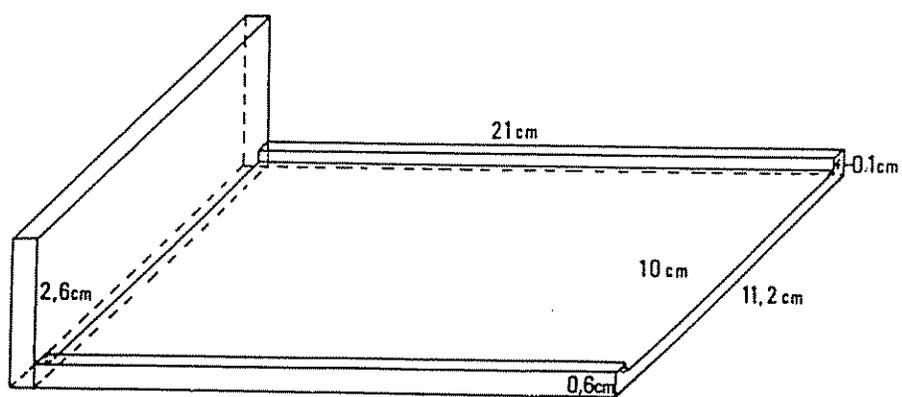
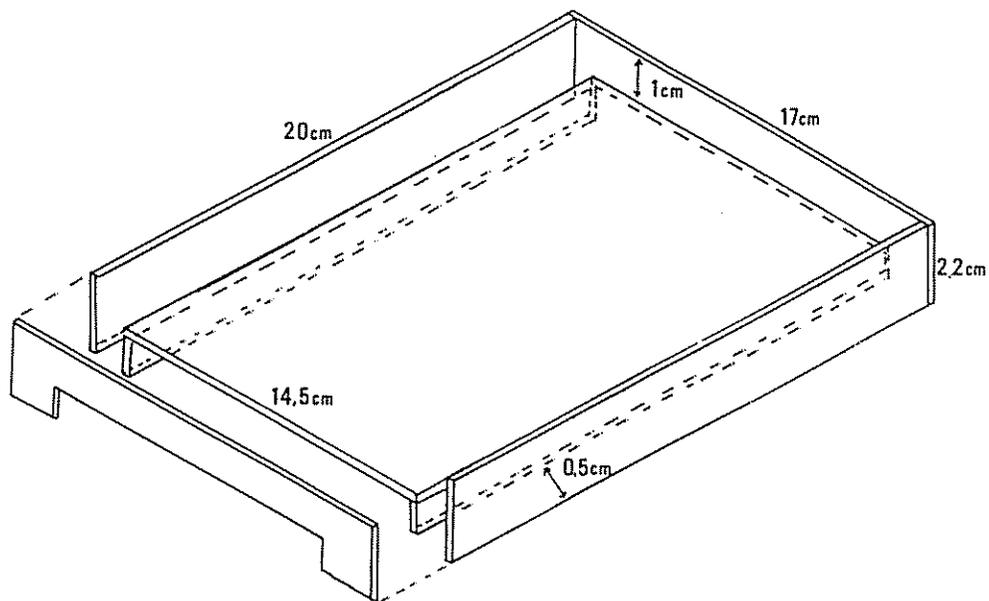
Tris	24.2 g
H ₂ O	aforar a 1 litro
pH=8.0	aprox. 11 ml de HCl conc.

Acetato/NaOH 0.15 M pH 5.0 (Acetato B):

Ac. acético glacial	9.3 ml
NaOH	5.1 g
H ₂ O	aforar a 1 litro

ANEXO 5

Representación esquemática del molde para migración
en gel de almidón y guía de corte.



ANEXO 6

Sistemas enzimáticos estudiados en los cruzamientos
interespecificos de Musa.

Peroxidasa - PRX

Acetato B	40.0 ml
Guayacol	0.5 ml
15 min a temp. ambiente	
agregar 3 gotas de H ₂ O ₂ 35%	

Malato deshidrogenasa - MDH

Tris A	35 ml
Malato de sodio 1 M pH 7.0	5 ml
NAD 1%	1 ml
MTT 1%	1 ml
PMS 0.1%	1 ml
MgCl ₂ 0.5 M	1 ml

Isocitrato deshidrogenasa - IDH

Tris A	50.0 ml
MgCl ₂ 0.5 M	1.0 ml
NADP 1%	0.5 ml
NBT 1%	1.0 ml
PMS 0.1%	1.0 ml
MTT 1%	0.5 ml
Isocitrato de sodio	200.0 mg

ANEXO 7

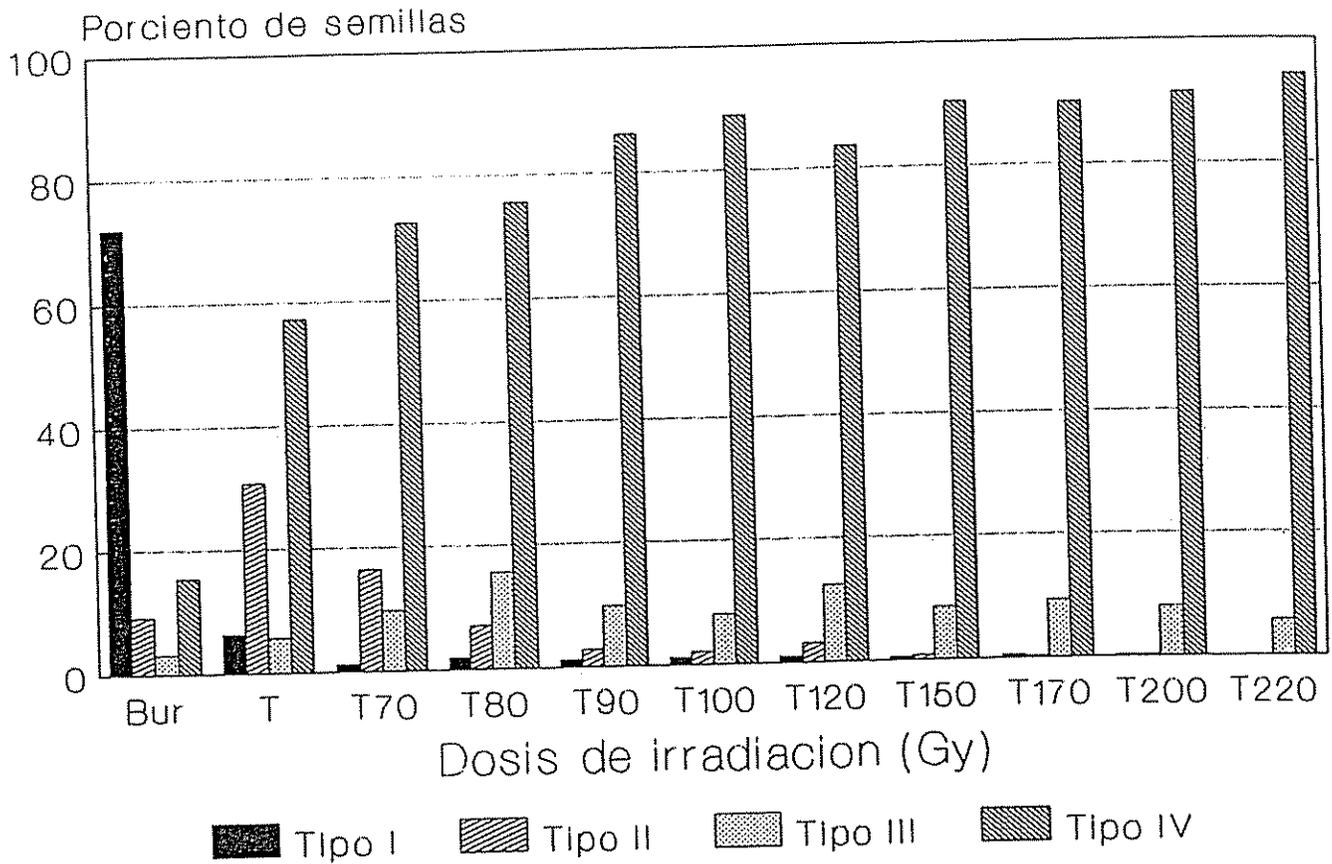


Figura 1A. Identificación de semillas de *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* obtenidas por hibridación con polen de *Musa balbisiana* tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.

ANEXO 8

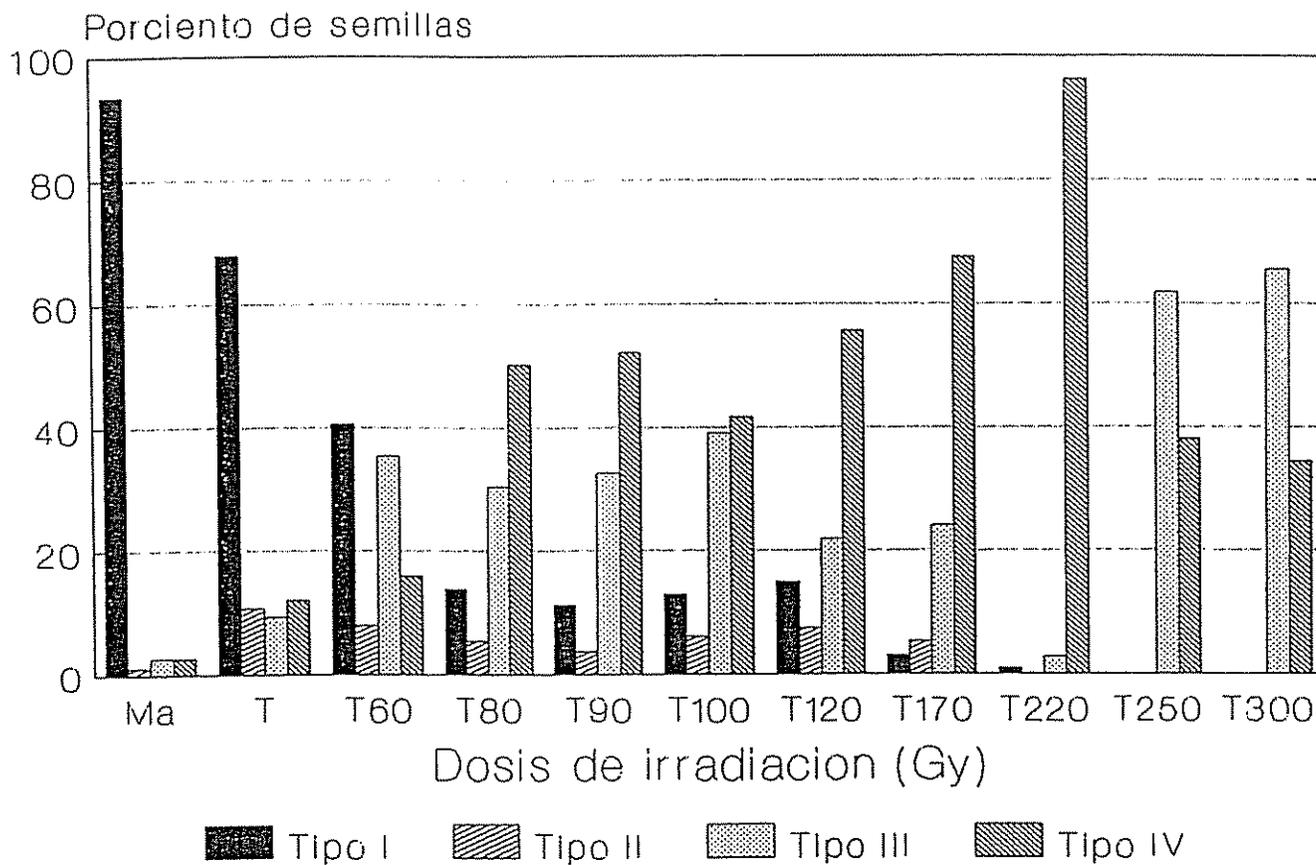


Figura 2A. Identificación de semillas de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* obtenidas por hibridación con polen de *Musa balbisiana* tipo Tani en diferentes dosis de irradiación.

ANEXO 9



Musa acuminata spp. *malaccensis*



Inflorescencia de *M.a.ssp. burmannicoïdes*



Musa halbisiana tipo TANI



Musa ornata



Musa becarii

ANEXO 10



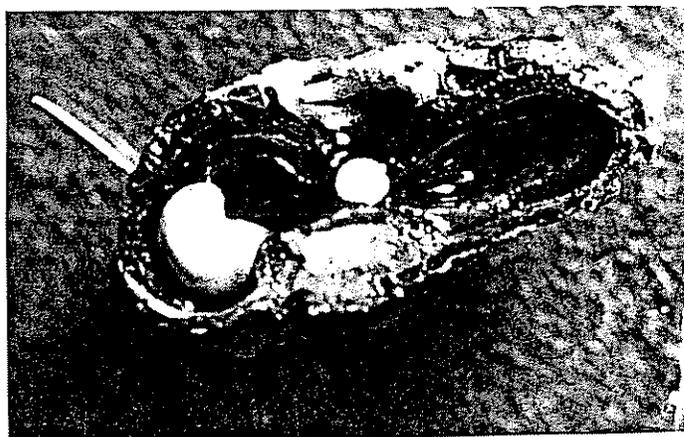
Semilla Tipo I



Semilla tipo II



Semilla tipo IV

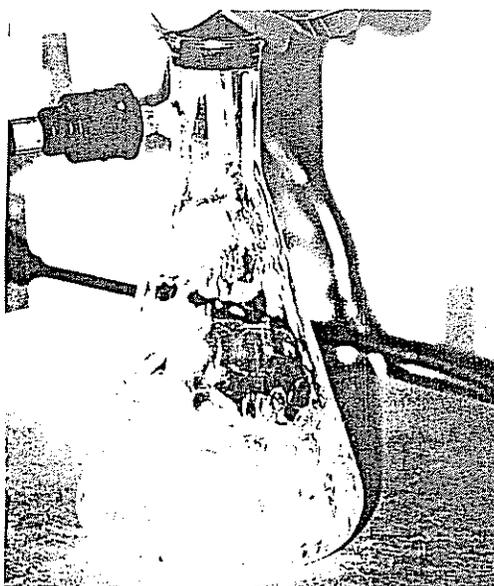


Semilla tipo II, producto de irradiación

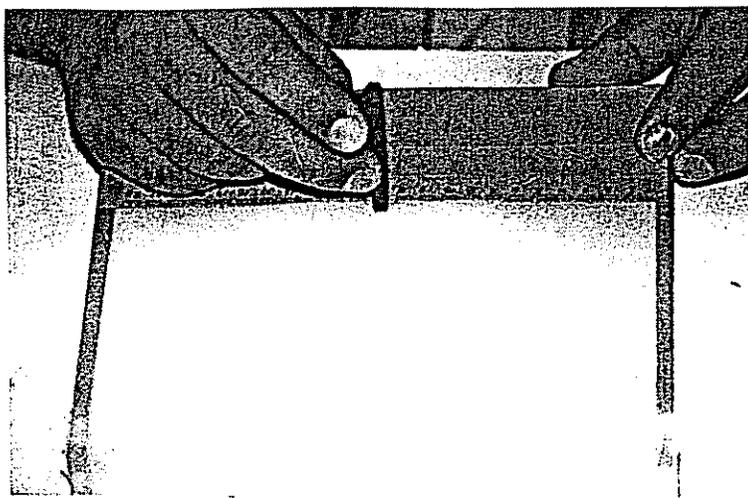
ANEXO 11



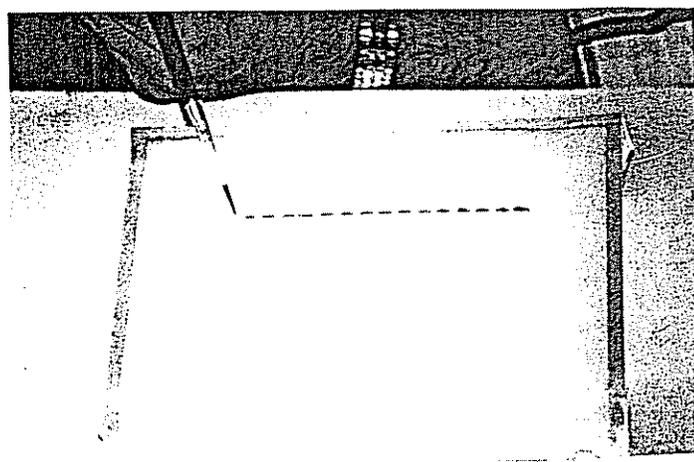
Extracción de tejidos de la hoja 3



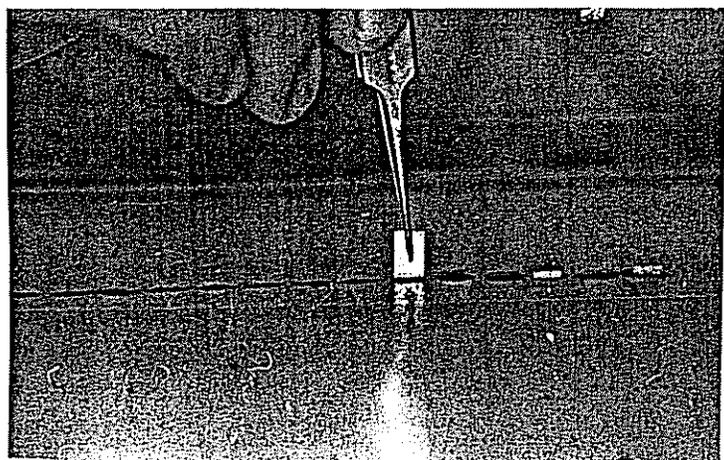
Degacificación para la preparación del gel de almidón



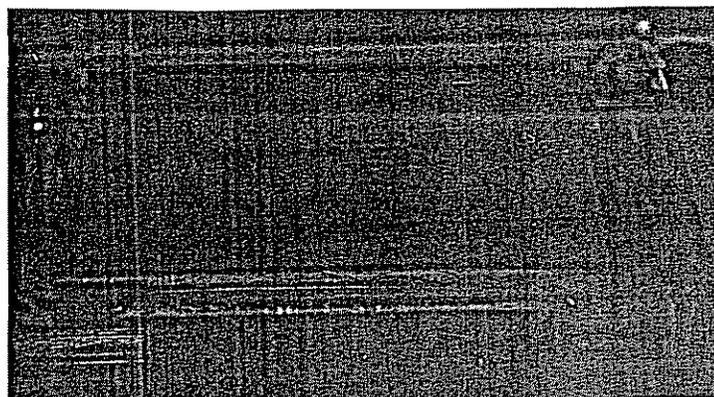
Perforación del gel



Aplicación del bromofenol como indicador de la migración



Siembra de los extractos



Migración de las proteínas

ANEXO 12



Peroxidasa (PRX)



Malato deshidrogenasa (MDH)