

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

PARTENOGENESIS INDUCIDA EN *Musa spp.* PARA LA OBTENCIÓN DE
PLANTAS HAPLOIDES.

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

Magister Scientiae

Por:

HUMBERTO ANTONIO LEBLANC UREÑA

Turrialba, Costa Rica

1991

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

MAGISTER SCIENTIAE

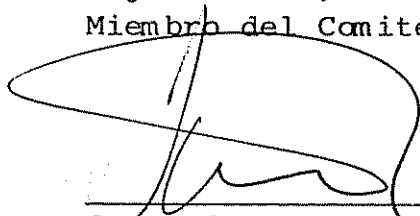
COMITE ASESOR:




Jean-Vincent Escalant, Ph.D.
Profesor Consejero



Magalie Dufour, Ph.D.
Miembro del Comité



Ramiro Jaramillo,
Miembro del Comité



Nelly Vásquez Morera, MSc.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Maestría



Humberto Leblanc Ureña
Candidato

A mis padres Humberto Leblanc R y Lastenia Ureña de Leblanc.

A mi esposa Lurys Miranda de Leblanc.

AGRADECIMIENTO

El autor agradece a:

- Al Convenio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), quien financió mis estudios en el CATIE.
- AL Laboratorio de Investigaciones Biológicas de México Centroamérica y Panamá (DIRSA), quienes facilitaron la fuente de Cobalto 60, utilizada en este trabajo.
- A Jean Vincent Escalant Ph.D., profesor consejero en este estudio.
- A Ramiro Jaramillo Msc., Por sus observaciones.
- A Nelly Vásquez, por sus explicaciones en histología.
- A todo el comité asesor de esta investigación.
- A todo el personal de la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIA	Acido Indol Acético.
BAP	Bencil Amino Purina.
MS	Medio Murashige y Skoog.
Kr	Kilorad (1 Kr=1000 rad).

CONTENIDO

RESUMEN	ix
SUMMARY	xii
RÉSUMÉ	xv
LISTA DE CUADROS	xviii
LISTA DE FIGURAS	xxi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	7
1. Obtención de haploides a través de polinización con polen irradiado.	7
2. Germinación de polen <i>in vitro</i>	12
3. Clasificación taxonómica de las Musaceas.	14
3.1. Grupo AA.	16
3.2. Grupo AAA.	17
3.3. Grupo AAAA.	18
3.4. Grupo AAB.	19
3.5. Grupo ABB.	19
3.6. Grupo AB BB.	20
4. Botánica y morfología vegetal.	21
4.1. Sistema radical.	21
4.2. Tallo.	24
4.3. Hojas.	24
4.4. Inflorescencia.	25
4.5. Flores.	26
4.6. Frutos.	29
4.7. Semillas.	29
5. Citogenética de los bananos silvestres.	30
6. Polinización de los bananos silvestres.	35
III. MATERIALES Y METODOS	40
1. Pruebas preliminares.	40
1.1. Microesporogénesis y forma de la tétrade. .	40
1.2. Viabilidad y germinación del polen.	41
1.3. Variables evaluadas.	43
1.4. Análisis estadístico.	44

2.	Conservación de polen.	46
2.1	Variables evaluadas.	46
2.2	Análisis estadístico.	47
3.	Irradiación de polen.	47
3.1	Variables evaluadas.	48
4.	Polinización con polen irradiado.	48
4.1	Variables evaluadas.	51
5.	Estudio histológico.	51
6.	Rescate de embrión.	52
6.1.	Variables evaluadas.	53
7.	Microscopia electrónica.	53
8.	Coloración de ADN.	54
9.	Cariotipo.	54
IV.	RESULTADOS	56
1.	Pruebas preliminares.	56
1.1.	Microesporogénesis y forma de la tétrade. .	56
1.2.	Viabilidad del polen.	57
1.3.	Germinación del polen.	60
2.	Conservación de polen.	63
3.	Irradiación de polen.	64
4.	Polinización con polen irradiado.	68
5.	Estudio histológico.	74
6.	Rescate de embrión.	84
7.	Coloración de ADN.	89
8.	Cariotipo.	92
V.	DISCUSION	93
1.	Pruebas preliminares.	93
1.1.	Microesporogénesis y forma de la tétrade. .	93
1.2.	Viabilidad y germinación del polen.	93
2.	Conservación del polen.	95
3.	Irradiación del polen.	96

4. Polinización con polen irradiado.	97
VI. CONCLUSIONES	103
VII. RECOMENDACIONES.	106
VIII. LITERATURA CITADA	107
IX. ANEXOS	113

Leblanc, H.A. 1991. Partenogénesis inducida en *Musa spp*, para la obtención de plantas haploides. Tesis Mg. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 120 P.

Palabras claves: *Musa acuminata ssp burmannicoides*, *Musa balbisiana* tipo TANI, haploide, partenogenesis, radiación gamma.

RESUMEN

En la actualidad el mejoramiento de los materiales diploides en musaceas es la etapa indispensable en el mejoramiento del banano y el plátano. Una de estas miras es la obtención de líneas homocigotas. La obtención de plantas homocigotas, aunque posible a través de autofecundaciones, demoraría de ocho a diez años. Por consiguiente, la partenogénesis inducida a través de la polinización con polen irradiado, podría constituir una alternativa más rápida. Este método consiste en la formación de plantas haploides, cuyo lote de cromosomas se puede duplicar con colchicina para formar plantas homocigotas. Con base en esto, se plantearon los siguientes objetivos: encontrar un método que permita evaluar el porcentaje de germinación del polen de *Musa acuminata ssp burmannicoides* y de *Musa balbisiana* tipo TANI; determinar si el polen de estas subespecies es capaz de germinar después de ser sometido a diferentes dosis de radiación gamma; determinar si el polen así tratado es capaz de estimular el desarrollo de la semilla sin que ocurra la fertilización; analizar histológicamente el desarrollo de las semillas obtenidas, después de polinizar con el polen

sometido a diferentes dosis de radiación; determinar la utilidad de la técnica de polinización con polen irradiado, en la formación de plantas haploides en *Musa spp.*

El polen de *M.acuminata ssp burmannicoides* y de *M.balbisiana* tipo TANI, fué irradiado con diferentes dosis de radiación gamma, para polinizar plantas de *M.acuminata ssp burmannicoides*. El polen fué capaz de germinar después de ser irradiado a cualquiera de las dosis utilizadas. En todos los tratamientos se logró la formación de semillas.

El estudio histológico permitió determinar los intervalos de radiación más apropiados para el desarrollo de los embriones. En estas dosis se logró obtener plantas completas a través del rescate de embrión.

Para la determinación del nivel de ploidía de las plantas obtenidas, se utilizaron dos métodos: primero se evaluó el número de cromosomas realizando un cariotipo; el otro método fué el análisis de citometría en flujo, el cual consistió en evaluar el volumen de ADN de los núcleos.

Muchas de las plantas evaluadas fueron encontradas diploides. Sin embargo en las plantas obtenidas en el tratamiento 5 Kr (*M.acuminata ssp burmannicoides* por

M. balbisi tipo TANI), se encontró una planta haploide con 11 cromosomas ($n=11$) y en el tratamiento 7 Kr (*M. acuminata* ssp *burmannicoides* por *M. acuminata* ssp *burmannicoides*), se encontró otra planta haploide con 11 cromosomas ($n=11$).

Leblanc, H.A. 1991. induced parthenogenesis in *Musa spp*, for the obtention of haploid plants. Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 120 p.

Keywords: *Musa acuminata ssp burmannicoides*, *Musa balbisiana* type TANI, haploid, parthenogenesis, gamma radiation.

SUMMARY

Nowadays, the improvement of diploid materials in musaceas is the essential step to improve banana and plantain and one of its main goals is the obtention of homocygotes lines. Even though homocygotes plants can be obtained through auto-fecundation, it will take from eight to ten years to accomplish it. For that reason, induced parthenogenesis through irradiated pollen pollinization could be a more feasible alternative. This method involves formation of haploid plants whose lot of chromosomes can be duplicated with colchicine to form homocygote plants.

The main objectives of this research were:

- to find a method in order to evaluate pollen germination percentage of *Musa acuminata ssp burmannicoides* and *Musa balbisiana* type TANI;
- to determine if pollen of these sub-species is able to germinate after been under different dosis of gamma radiation and if after such treatment it is

still able to stimulate seed development but no fertilization;

- to make a histological analysis of the development of seeds obtained after pollinization with pollen under different dosis of radiation;
- to determine if this pollinization technique is usefull to induce formation of *Musa spp.* haploid plants.

Pollen from *M. acuminata ssp burmannicoides* and *M. balbisiana* type TANI was irradiated with different dosis of gamma radiation to pollinizate plants of *M. acuminata ssp burmannicoides*. This pollen was able to germinate after its irradiation with any of the dosis utilized. Formation of seeds was possible in all treatments.

The histological study allowed to determine the best radiation intervals for embryos development, and with such dosis, it was possible to obtain complete plants through the rescue of embryos.

To determine the ploidy level of these plants, two methods were used: in the first one, the number of chromosomes was evaluated making a karyotype; and the second was an in-flow cytometric analysis, that is, an evaluation of the nucleus ADN volumen.

rMany of the plants evaluated were diploid; nevertheless, among the plants obtained with treatment 5 Kr (*M. acuminata* ssp *burmannicoides* x *M. balbisiana* type TANI) one was haploid and had 11 chromosomes (n=11). Another haploid plant was obtained with treatment 7 Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* x *M.acuminata* ssp *burmannicoides*).

Leblanc, H.A. 1991. Parthénogenèse induite chez *Musa* spp., pour l'obtention de plantes haploïdes. Thèse de Master en Sciences, Turrialba, Costa Rica, CATIE, 120 P.

Mots clés: *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*, *Musa balbisiana* type TANI, haploïde, parthénogenèse, radiation gamma.

RÉSUMÉ

A l'heure actuelle, l'amélioration génétique des espèces diploïdes chez les musacées est une étape indispensable pour l'amélioration des bananiers et bananiers plantains. L'un des objectifs est l'obtention de lignées homozygotes. Bien que la création de plantes homozygotes soit possible par la voie classique de l'autofécondation, cela demanderait entre 8 et 10 ans de travail. Par conséquent, l'induction de parthénogenèse par la pollinisation à l'aide de pollen irradié, pourrait être une alternative plus rapide. Cette méthode permet l'obtention de plantes haploïdes dont le lot de chromosomes est doublé grâce à l'action de la colchicine permettant ainsi la formation de plantes homozygotes. En référence à cela, les objectifs suivants ont été plantés: trouver une méthode permettant d'évaluer le pourcentage de germination du pollen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* et *Musa balbisiana* type TANI; déterminer si le pollen de ces deux sous-espèces est capable de germer après avoir été soumis à différentes doses de radiation gamma; déterminer si le pollen ainsi irradié peut stimuler le développement de la

graine sans qu'il y ait eu fécondation; faire l'analyse histologique du développement des graines obtenues après pollinisation avec du matériel soumis à différentes doses d'irradiation; déterminer l'intérêt de la pollinisation avec pollen irradié pour l'obtention de plantes haploïdes chez *Musa spp.*

Le pollen de *Musa acuminata ssp burmannicoides* et de *Musa balbisiana* type TANI, a été irradié avec différentes doses de radiation gamma, dans le but de polliniser des plantes de *Musa acuminata ssp burmannicoides*. Le pollen s'est avéré capable de germer quelque soit la dose utilisée. Dans tous les traitements on a pu obtenir la formation de graines.

L'étude histologique a permis de déterminer les doses de radiation les plus appropriées à l'obtention d'embryons. On a pu après utilisation de ces doses, obtenir des plantes par le sauvetage in vitro des embryons.

Deux méthodes ont été utilisées pour la détermination du niveau de ploïdie des plantes obtenues: premièrement, on a réalisé un comptage chromosomique à partir de cariotypes; l'autre méthode traitée de l'analyse de cytométrie en flux qui permet d'évaluer le volume de l'ADN nucléaire.

Beaucoup des plantes évaluées ont été reconnues comme diploïdes. Cependant, il a été possible de détecter deux plante haploïde ($n=11$) issue des traitements: 5 Kr (*Musa acuminata* ssp *burmannicoides* X *Musa balbisiana* type TANI) et 7 Kr (*Musa acuminata* ssp *burmannicoides* en autofecundali).

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.		Página
Cuadro 1.	Factores y niveles utilizados para la germinación del polen de la subespecie <i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , en medio líquido.	42
Cuadro 2.	Tinción diferencial para evaluar viabilidad del polen. ..	44
Cuadro 3.	Tiempos necesarios para lograr las diferentes dosis de radiación.	48
Cuadro 4.	Microesporogénesis del diploide <i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	56
Cuadro 5.	Conteo de las diferentes formas de tétrade encontradas.	57
Cuadro 6.	Porcentajes de germinación del polen de <i>M. acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , estimados a través de diferentes colorantes.	58
Cuadro 7.	Medias aritméticas y prueba de Duncan del experimento de tinción del polen de <i>M. acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , expresadas en porcentaje.	59
Cuadro 8.	Porcentajes de germinación del polen de <i>Musa balbisiana</i> tipo TANI, estimados a través de colorantes.	59
Cuadro 9.	Medias aritméticas y probabilidades en el experimento de tinción del polen de <i>Musa balbisiana</i> tipo TANI.	60
Cuadro 10.	Resultados de la prueba de conservación de polen, expresados en porcentaje.	63
Cuadro 11.	Medias aritméticas y probabilidades del experimento de conservación del polen de <i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	64
Cuadro 12.	Germinación sobre los estigmas del polen de <i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , sometido a diferentes dosis de radiación gamma.	65

Cuadro 13.	Conteo de polen germinando de <i>Musa balbisiana</i> tipo TANI, sobre estigmas de <i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	65
Cuadro 14.	Tamaño en mm de las semillas obtenidas por polinizaciones con polen irradiado de <i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	69
Cuadro 15.	Tamaño en mm de las semillas obtenidas por polinizaciones interespecíficas con polen irradiado de <i>Musa balbisiana</i> tipo TANI.	70
Cuadro 16.	Formación de callos a partir de embriones de 55 días.	86
Cuadro 17.	Porcentaje de germinación de embriones maduros.	87

ANEXOS

Anexo	Página
Anexo 1. Colorante de Alexander.	114
Anexo 2. Diacetato de fluoresceína (DcF).	115
Anexo 3. Medio de germinación del polen (medio del CIRAD modificado).	116
Anexo 4. Colorante " Z ".	117
Anexo 5. Medio de Murashige y skoog (Ms), 1962.	118
Anexo 6. Colorante DAPI.	119
Anexo 7. Citometría en Flujo.	120

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
Figura 1.	Vista esquemática de una planta de banano (Champion, 1962).	23
Figura 2.	Flores del banano. st (stigma); str (estigma reducido); et (estaminoide); etr (estaminoide reducido); tp (tépalo libre); p (perigoneo); ov (ovario).	28
Figura 3.	Tipos de desarrollo de los gametófitos masculinos en las angiospermas (Maheshwari, 1950).	33
Figura 4.	Saco embrionario de <i>Musa spp</i> , tipo monospórico (Bouharmont, 1963).	34
Figura 5.	Procesos en la reproducción de una semilla. Empezando con las esporas células madre en las anteras y en los óvulos, se sucede una serie de eventos que culminan en la fertilización y formación final de la semilla (Poehlman, 1983).	38
Figura 6.	Corte esquemático de una semilla madura de <i>Musa spp</i> . (Bouharmont, 1963).	39
Figura 7.	Bolsa de polinización utilizada para evitar la entrada de polen extraño.	50
Figura 8.	Microesporogénesis. a. Célula madre; b. Meiosis.	62
Figura 9.	Microesporogénesis. a. Tétrade esférica b. Estado uninucleado.	62
Figura 10.	Polen de <i>Musa acuminata ssp burmannicoides</i> germinando in vitro.	62
Figura 11.	Polen de <i>M.acuminata ssp burmannicoides</i> germinando sobre los estigmas. a. Granos de polen mostrando sus tubos germinativos (80X) b. Germinación de un grano de polen (400 X).	66

Figura 12.	Porcentaje de germinación del polen de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , a diferentes dosis de radiación.	67
Figura 13.	Porcentaje de germinación del polen de <i>M.balbisiana</i> tipo TANI, a diferentes dosis de radiación.	67
Figura 14.	Racimo de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> polinizado con polen irradiado.	71
Figura 15.	Tamaño de semilla obtenido por polinizaciones con polen irradiado de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i>	72
Figura 16.	Tamaño de semilla obtenido por polinizaciones con polen irradiado de <i>M.balbisiana</i> tipo TANI.	72
Figura 17.	Recorrido de los tubos polínicos a cualquiera de las dosis utilizadas. a. Tubos germinativos en el estigma; b. Tubo bajando por el estilo.	73
Figura 18.	Recorrido de los tubos polínicos a cualquiera de las dosis utilizadas. a. Tubo pasando entre los pelos pluricelulares con mucilago; b. tubo haciendo contacto con un óvulo. ...	73
Figura 19.	Corte histológico de una semilla de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , mostrando la ausencia del embrión. Tratamiento 20 Kr. a. A los 45 días (10X); b. A los 55 días (10 X).	77
Figura 20.	Corte histológico de una semilla de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , tratamiento 30 Kr. a. A los 15 días (10X); b. A los 55 días (10X).	77
Figura 21.	Corte longitudinal de una semilla de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> a los 45 días, mostrando la ausencia del endospermo. Tratamiento 20 Kr.	78
Figura 22.	Corte histológico de una semilla de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , mostrando la presencia del endospermo; tratamiento 10 Kr, a los 35 días (10X).	78

Figura 23.	Corte longitudinal de una semilla de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , mostrando la presencia del endospermo; tratamiento 10 Kr.	78
Figura 24.	Corte histológico de una semilla testigo (polen sin irradiar). a. Proembrión unicelular a los 15 días (20X); b. proembrión multicelular a los 25 días (10X).	79
Figura 25.	Corte histológico de una semilla testigo (polen sin irradiar). a. Embrión a los 45 días b. Embrión a los 55 días.	79
Figura 26.	Corte longitudinal de una semilla de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> a los 55 días, mostrando la presencia del endosperma en el tratamiento testigo.	80
Figura 27.	Corte radial de un banano sin polinizar. Mostrando óvulos necrosados a los 15 días.	80
Figura 28.	Semilla formada por el polen de <i>M.balbisiana</i> tipo TANI sobre <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> . Mostrando un embrión degenerado a los 45 días. Tratamiento 20 Kr (20X).	81
Figura 29.	Embrión formado a los 45 días utilizando polen de <i>M.balbisiana</i> tipo TANI, sobre <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> . Tratamiento 10 Kr (20X).	81
Figura 30.	Embriones formados a los 55 días en autopolinizaciones con polen irradiado <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> . a. Tratamiento 3 Kr (20X); b. Tratamiento 5 Kr (10X).	82
Figura 31.	Embrión formado a los 45 días en autopolinizaciones de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> . Tratamiento 7 Kr (20X). ...	82
Figura 32.	Embriones formados a los 45 días por polinizaciones con polen irradiado de <i>M.balbisiana</i> tipo TANI sobre <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> . a. Tratamiento 3 Kr (10X) b. Tratamiento 5 Kr (10X).	83

Figura 33.	Embrión formado a los 45 días por polinización con polen irradiado de <i>M.balbisiana</i> tipo TANI sobre <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> Tratamiento 7 Kr (10X).	. 83
Figura 34.	Callo formado de un embrión de 55 días. Tratamiento 7 Kr. Cruce <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> por <i>M.balbisiana</i> tipo TANI.	. 88
Figura 35.	Embrión de 80 días, germinando in vitro. Tratamiento 7 Kr. Cruce <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> por <i>M.balbisiana</i> tipo TANI.	. 88
Figura 36.	Embrión maduro a los 80 días, mostrando ausencia de endosperma. Tratamiento 5 Kr. Cruce <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> por <i>M.balbisiana</i> tipo TANI. 88
Figura 37.	Polen testigo de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , mostrando el núcleo generativo y el núcleo vegetativo. 90
Figura 38.	Polen de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> mostrando su material nuclear completamente desorganizado. Tratamiento 50 Kr. 90
Figura 39.	Tubo polínico de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> , mostrando los dos gametos descendiendo. 91
Figura 40.	Tubo polínico de <i>M.acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> mostrando el descenso de una cromatina desorganizada. Tratamiento 8 Kr.	. 91

I. INTRODUCCION

Según Rowe (1985), el fitomejoramiento del banano tuvo sus comienzos en 1922, en el Colegio Imperial de Agricultura Tropical y en 1924 en Jamaica. Estos programas proporcionaron los conocimientos básicos para el mejoramiento de banano.

Luego de un breve intento por mejorar los bananos en los años 30, la United Fruit Company comenzó en 1959 un programa extensivo de mejoramiento del cultivo en Honduras.

Una anomalía genética permite el mejoramiento del banano. El "Gros Michel" (*Musa AAA*), produce un promedio de dos semillas por racimo cuando es polinizado por diploides (Shepherd, 1954). Se encontró que el "Gros Michel" no pasa por un proceso normal de meiosis durante la reproducción sexual, sino que tiene gametos triploides no reducidos. El polen del progenitor diploide pasa por un proceso normal de meiosis y las progenies de los cruces con "Gros Michel" son tetraploides; así mismo se producen algunas progénies heptaploides inútiles, debido aparentemente a la doble restitución durante la formación de algunos gametos de "Gros Michel".

Varios híbridos tetraploides resistentes al Mal de Panamá, fueron sintetizados del "Gros Michel" durante las

primeras etapas de fitomejoramiento, los cuales se acercaban mucho a una aceptabilidad comercial. Sin embargo, los progenitores diploides poseían características agronómicas inferiores a las que se manifestaban en sus híbridos.

Los triploides secundarios producidos por polinizaciones cruzadas de tetraploide por diploide fueron inútiles. La inferioridad de estos triploides secundarios comparados con los tetraploides primarios se explicó fácilmente desde el punto de vista genético. Mientras que los tetraploides primarios contenían los tres genomas intactos de "Gros Michel", los triploides secundarios eran el producto de una meiosis donde habían participado los juegos de cromosomas "Gros Michel" (Dodds, 1943).

Después de más de 60 años de esfuerzos continuos en estos trabajos, no se han producido hasta la fecha muchos cultivares de banano o plátano que tengan las características agronómicas que sean comercialmente aceptables. Los pocos cultivares producidos, están en la etapa de evaluación, puesto que sus características todavía no igualan a la de los triploides naturales que se siembran comercialmente.

El "Highgate", un mutante enano del "Gros Michel", se ha convertido en el prototipo del progenitor femenino. No obstante, todos los progresos están sujetos al desarrollo de mejores progenitores diploides (Later, 1934).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se ha concluido que el progreso en el desarrollo de cultivares de banano depende del mejoramiento de nuevos progenitores diploides masculinos, puesto que en el pasado se trabajó con los diploides en su estado silvestre sin haber obtenido mejores progenies. Además, se han encaminado las investigaciones hacia la búsqueda de tipos comercialmente aceptables entre las progenies de tetraploides primarios de cruzamientos del "Gros Michel".

En consecuencia, el mejoramiento del germoplasma (AA) más allá de ser un objetivo, es una exigencia imprescindible para obtener los mejores resultados a partir de otras metodologías teniendo en cuenta nuevos cultivares (Shepherd *et al*, 1986).

En este trabajo se pretende iniciar un proceso alternativo de mejoramiento del diploide *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*, el cual actualmente se emplea como progenitor masculino en varios programas de mejoramiento por su característica de ser fértil y poseer adecuada cantidad de polen viable. Pero lo que lo hace más importante es su resistencia a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), el cual se encuentra diseminado en América Central y en la parte norte de América del Sur causando severos daños en las plantaciones de bananos y plátanos.

Otro factor a considerar es que al mejorar este diploide, el mismo se puede utilizar tanto en el mejoramiento del plátano como del banano.

Se considera de gran importancia el encontrar una metodología que conduzca hacia la formación de plantas haploides en los materiales silvestres y por consiguiente la formación de plantas homocigotas, puesto que según Barkry *et al* (1990), la investigación en la producción de líneas homocigotas para todos los diploides es uno de los objetivos principales en la estrategia del mejoramiento del banano.

La consecución de este objetivo ha resultado difícil debido a que aunque podría lograrse a través de autopolinizaciones, se tardaría más de 10 años en su obtención. La dificultad se ve reforzada por la misma biología floral del género *Musa*, puesto que primero emergen las flores femeninas y luego salen las flores masculinas, lo cual obliga a trabajar con diferentes plantas de una misma cepa. Una vía a seguir es la utilización de los haplométodos, los cuales si tienen éxito garantizarían la homocigosis total en un tiempo corto.

En este trabajo se utilizará la técnica de la polinización con polen irradiado. Con esta técnica se busca que el polen irradiado conserve su capacidad de germinar, más no la de fertilizar la oosfera, previendo como resultado que

el tubo polínico al germinar y hacer contacto con la oosfera, produzca un estímulo que podría permitir que ocurra el desarrollo partenogenético, con la formación de un embrión haploide, el cual puede ser rescatado por el cultivo *in vitro*.

Este trabajo es una etapa importante de la investigación puesto que sería el punto de partida para la formación de plantas homocigotas (duplicando los cromosomas de las plantas haploides con colchicina), y consecuentemente, el tener acceso a informaciones genéticas necesarias para el posterior avance del mejoramiento genético de los diploides.

La hipótesis de este trabajo plantea que tanto el polen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* como el de *Musa balbisiana* tipo TANI, pueden germinar al ser sometidos a la radiación gamma. Dependiendo de la dosis utilizada, al polinizar plantas con el polen así tratado, este no será capaz de fertilizar la oosfera, pero si de estimular el desarrollo partenocárpico o partenogenético de los tejidos de la semilla y de la oosfera.

Los objetivos de este trabajo son:

- Encontrar un método que permita evaluar el porcentaje de germinación del polen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* y de *Musa balbisiana* tipo TANI.

- Determinar si el polen de estas subespecies es capaz de germinar después de ser sometido a diferentes dosis de radiación gamma.

- Determinar si el polen irradiado es capaz de estimular el desarrollo de la semilla y de sus tejidos internos pero sin fertilizarla.

- Analizar histológicamente cuales tipos de estructuras internas de la semilla se forman y cuales no, después de polinizar con polen sometido a diferentes dosis de radiación gamma.

- Determinar la utilidad de la técnica de polinizar con polen irradiado, en la formación de plantas haploides en diploides AA.

II. REVISION DE LITERATURA

1. Obtención de haploides a través de polinización con polen irradiado.

La obtención de plantas haploides por medio de la polinización con polen irradiado tiene uno de sus primeros antecedentes en 1933, cuando Katayama reportó la obtención de tres plantas haploides de *Triticum monococcum*, utilizando como fuente de radiación los Rayos - X. Según Katayama(1933), la polinización con polen maduro de plantas enmascaradas tres días antes, permitió obtener el mayor número de plantas haploides (16 de un total de 91 individuos, o sea un 17,58%). Así, demostró que el estímulo del tubo polínico puede activar el desarrollo partenogenético de la oosfera.

Según Lacadena (1974), los agentes físicos más comunes para inducir la haploidía son las radiaciones ionizantes (rayos - X, rayos gamma, radioisótopos), las radiaciones no ionizantes (luz ultravioleta) y los choques de temperatura. De acuerdo con la información recopilada anteriormente, la mayoría de las técnicas utilizadas consistían en la polinización normal de plantas con polen irradiado. Sólo en algunos pocos casos el saco embrionario fue irradiado y polinizado con polen sin irradiar.

Montezuma-de-Carvalho (1967), señaló la posibilidad de que los rayos - X inhiban la segunda mitosis del polen. Este núcleo diploide no es capaz de fertilizar la oosfera, sin embargo el tubo polínico crece sin afectarse, estimulando a la oosfera a dividirse (partenogénesis). Por otra parte Pandey y Phung (1982), han denominado este fenómeno como "transformación del huevo", refiriéndose claramente al desarrollo partenogenético de la oosfera; según este autor, el mecanismo envuelve una "inyección" en la oosfera de ADN "pulverizado", por parte del tubo polínico del polen sometido a radiación.

En un estudio con polen irradiado y polen sin irradiar Grant *et al* (1980), trataron de determinar la capacidad de fecundación del polen después de la irradiación, en las especies *Nicotiana alata* y *Nicotiana langsdorffii*. Para observar los cromosomas en la metafase de la segunda mitosis, el polen irradiado y el no irradiado, fue incubado por 16-21 horas a 25°C-28°C. en la oscuridad, en medio líquido de germinación. Este medio contenía 3 % de lactosa, 0,05 % de colchicina y 0,01 % de ácido bórico.

En varios granos de polen germinados (polen no irradiado) de *N. alata* y de *N. langsdorffii*, se observó que el núcleo generativo estaba en la metafase de la segunda mitosis, con nueve cromosomas normales. Pero el núcleo

generativo del polen irradiado, en dosis de 25 Kr, 80 Kr, 100 Kr para *N. alata* y 80 Kr para *N. langsdorffii* mostraron fragmentos de cromatina más pequeña que las normales. La cromatina se condensa, pero no fue visible su organización en la metafase (Grant *et al*, 1980).

De acuerdo con estos mismos autores, no hubo diferencias notables en los grados de fragmentaciones para las diferentes dosis de irradiaciones. En muestras incubadas sin colchicina por 24 horas, no se observaron tubos polínicos en los cuales el núcleo generativo se dividiera.

Según Powel *et al* (1983), en experimentos con *Hordeum vulgare* se irradió el polen de esta especie inmediatamente antes de la polinización, usando radiación gamma obtenida de una fuente de Cobalto 60. En una serie de experimentos pilotos, Powel estableció que la dosis máxima de radiación, en la que resultan embriones viables, fue de 2000 rads. También se determinó que para asegurar la sobrevivencia de muchos embriones se debía aplicar ácido giberélico (GA3) en dosis de 75 ppm, un día antes de la polinización. Aproximadamente de 14 a 18 días después de la polinización, las carióspsides fueron removidas, desinfectadas superficialmente y los embriones transferidos a tubos con medio B5.

En un experimento con *Nicotiana*, Pandey y Phung (1982), recolectaron polen fresco, el cual se mantuvo seco en frascos de vidrio sobre silica gel; estos frascos fueron colocados a 30 cm de la fuente de cobalto y se irradiaron con varias dosis, variando su rango de 10 Kr a 100 Kr. Con el propósito de promover el desarrollo de frutos y semillas después de la polinización con el polen irradiado se aplicó β -naphthoxy ácido acético (1% en lanolina) al cáliz de las flores polinizadas.

En este mismo experimento se utilizaron 4 especies de *Nicotiana*: *Nicotiana alata* (N.a) ($2n = 18$), *Nicotiana langsdorffii* (N.I) ($2n = 18$), *Nicotiana glutinosa* (N.g) ($2n = 24$) y *Nicotiana tabacum* (n.t) ($2n = 48$), las cuales fueron cruzadas en 4 combinaciones usando polen irradiado (dosis específicas: 10,15, 20, 25, 30, 50, y 100 Kr.); en las combinaciones de N.I x N.I, N.I x N.a, N.t x N.g y N.t x N.a. En todas las combinaciones en las cuales se utilizaron dosis bajas (10 - 20 Kr.), disminuyó rápidamente el número de plántulas producidas. Algunas de estas plántulas murieron poco después de la germinación y muchas más murieron al llegar a la madurez. En la combinación N.I x N.I, sólo se produjeron semillas viables en las dosis de 10 y 15 Kr. En las combinaciones N.I x N.a, en dosis bajas, todas las plantas florecieron y mostraron una morfología híbrida variable para la forma de la flor (tamaño, color y varios

grados de esterilidad, incluyendo esterilidad completa). Se pudo observar que las dosis de irradiación son dependientes de las especies que se utilicen, aun dentro de una misma familia.

Sanford *et al* (1983), realizaron experimentos preliminares para determinar los efectos de diferentes dosis de radiación gamma sobre la viabilidad del polen de tomate, el crecimiento del tubo polínico y la capacidad de fertilización. Estos estudios demostraron que las dosis por arriba de 200 Kr de radiación gamma, reducen el crecimiento del tubo polínico pero no el porcentaje de germinación. La penetración de los tubos polínicos en los óvulos fue observada aun en los tratamientos de 200 Kr. No se obtuvieron semillas en los tratamientos que excedieron los 10Kr. Es decir que a dosis superiores de 10 Kr el polen perdía su capacidad de fecundar, pero conservaba su capacidad de germinar y de hacer contacto con los sacos embrionarios.

En un estudio reciente, Pandey *et al* (1990), estudiaron el desarrollo partenogenético de las semillas de la especie *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit), después de la polinización con polen irradiado. El polen fue irradiado a dosis de 0.5 K Gy, 0.7 K Gy, 0.9 K Gy. Todas estas dosis produjeron semillas partenogénicas. La dosis de 0.7 K Gy dio el mayor número de semillas germinadas (708 de un total de 723), de éstas 609

formaron plántulas y 334 sobrevivieron y llegaron a plantas. El nivel de ploidía fué evaluado en 416 plántulas, de las cuales 332 fueron hexaploides ("diploides" $2n=170$) y 84 fueron triploides ("haploides" $2n=85$).

2. Germinación de polen *in vitro*.

La germinación del polen es un proceso natural y necesario para la fertilización de la oosfera de la planta. Este proceso tiene lugar sobre el estigma, donde el grano de polen produce el tubo polínico el cual penetra el estilo y cruza hasta el ovario. La germinación del polen puede ser inducida *in vitro* en un medio de cultivo específico (Hoffmann *et al*, 1988).

Según Vasil (1987), el método más ampliamente usado para la germinación de polen *in vitro*, es el método de la gota pendiente, el cual consiste en poner los granos de polen en una gota de medio líquido, que se coloca en un portaobjetos con una cavidad o se le coloca un anillo. Este se cubre con un cubreobjetos y los espacios son sellados con lanolina o aceite mineral. Una vez logrado lo anterior el portaobjetos se invierte y la gota del medio que contiene el polen queda pendiente.

Para la germinación del polen de diferentes especies, se han utilizado medios simples y medios relativamente

complejos. En los medios simples básicamente se usa sacarosa y ácido bórico, a los cuales se agregan en los medios más complejos, nitrato de calcio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio (Vasil, 1987).

El azúcar (más comunmente la sacarosa), juega el papel específico de regulador osmótico durante la germinación del polen. Se ha determinado que la β -D fructo furanosa es el factor decisivo y determinante, en el efecto específico de la sacarosa durante el crecimiento del tubo polínico del polen en cultivo (Hrabetova y Tupy, 1964).

En cuanto al boro, se cree que regula la hidratación de los coloides y que está asociado a los compuestos polihidróxidos de la membrana del polen, además de estar involucrado en la síntesis de sustancias pécticas de la pared del tubo polínico (Schmucker, 1935). La excesiva ruptura de los granos de polen y de sus tubos polínicos, se encuentra a menudo cuando el boro está ausente del medio nutritivo y se ha determinado una correlación negativa entre la hidratación del tejido y el suministro de boro (Gauch y Duggar, 1954).

Según Vasil (1964), en experimentos con cucurbitáceas se demostró que el boro tiene gran efecto en la germinación del polen *in vitro*. En estos experimentos no se obtuvo germinación satisfactoria en soluciones de sacarosa sin boro;

las concentraciones de ácido bórico usadas variaron de 0,01% a 0,025%.

Otros efectos que deben tomarse en cuenta en la germinación del polen son: la densidad del polen en el medio de cultivo, el pH del medio de cultivo y la temperatura. A este respecto Vasil (1987), ha comprobado que los granos de polen cultivados en altas densidades, germinan mejor que los que son cultivados a bajas densidades. En cuanto al pH se ha encontrado que varía de acuerdo a la especie, pero para medios que contienen boro, el pH óptimo se encuentra en el intervalo de 6,5 a 7,1. La temperatura también varía de acuerdo con la especie, pero, para la mayoría de estas se encuentra en el intervalo de 20°C a 30°C.

3. Clasificación taxonómica de las Musaceas.

El banano pertenece al orden de los Zingiberales, familia de las Musaceas. Diversos autores están de acuerdo en que los Zingiberales constituyen un orden bien definido y aislado taxonómicamente. La familia de las Musaceas, está constituida por dos géneros: *Musa* y *Ensete* (Soto, 1990).

El género *Musa*, según Stover y Simmonds (1987), está constituido por cuatro secciones o series: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*. La sección *Australimusa* está formada por cinco o seis especies, de los cuales sólo

Musa textilis, tiene importancia económica en la extracción de fibra y por lo menos una especie se consume cocida en algunas islas del Pacífico (banano "Fei"). Las secciones Callimusa y Rhodochlamys comprenden de cinco a seis especies cada una. Las plantas se caracterizan por ser pequeñas y poco vigorosas con inflorescencias de crecimiento vertical y brácteas de color rosa o violeta brillante, lo cual las hace muy aceptables como plantas ornamentales.

La sección Eumusa, que tiene mayor difusión geográfica; presenta plantas de crecimiento y vigor variables. Está constituida por nueve o diez especies, de las cuales *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* en cruzamientos interespecíficos, han originado la mayoría de los cultivares de bananos y plátanos comestibles (Stover y Simmonds, 1987).

La especie *Musa acuminata* (AA), un diploide con un número de cromosomas de $2n = 22$. Es representada por plantas de porte bajo, con pseudotallos delgados y un sistema foliar reducido; estas plantas se caracterizan por presentar una coloración parduzca, que se convierte en manchas heterogéneas claramente definidas en las láminas de las hojas y en una coloración roja oscura, uniforme en las vainas internas del pseudotallo. Los racimos tienden a crecer horizontalmente, son pequeños, con dedos muy delgados que producen semillas (Stover y simmonds, 1987). De acuerdo con Champión (1968),

esta especie posee seis subespecies, las cuales son: malaccensis, burmannicoides, siamea, banksii, burmannica y microcarpa.

La especie *Musa balbisiana* (BB) posee igualmente 22 cromosomas. Es una planta más vigorosa, con un pseudotallo más claro, más espeso o compacto y de mayor tamaño. El racimo pende verticalmente y sus frutos son cortos, abundantes y poco erectos. Esta especie presenta pocas variaciones (Champion, 1968). Pero recientemente se tiende a dividir en subespecies, entre ellas tenemos por ejemplo: "camerum", "honduras", "singapuri", "tani" (Horry, 1989).

La composición ploidica y genómica de los diferentes clones estan señalados como A y B para representar los genomas de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, respectivamente. De acuerdo al mínimo de cromosomas y señalamientos para la preponderancia de características de cada una de las dos especies paternas, las abreviaturas A y B son utilizadas para formar grupos para la clasificación e identificación de cultivares específicos (Simmonds y Shepherd, 1955)

3.1. Grupo AA.

Según Soto (1990), en éste grupo se encuentran cultivares partenocárpicos que pueden ser fértiles. Son comestibles, como por ejemplo: el diploide conocido como

"Lady's Finger". Las plantas de éste grupo se caracterizan por tener poco vigor , aunque pueden crecer hasta cuatro metros de altura. El área foliar es pequeña, con hojas largas y angostas de color verde amarillento. Los pseudotallos son delgados y de cormos pequeños, pero soportan muy bien la acción del viento (volcamiento), resultado de un eficiente sistema radicular. Algunos son resistentes a la "enfermedad" de Panamá (*Fusarium oxysporum*) y muestran poca susceptibilidad a la "Sigatoka Negra" (*Mycosphaerella fijiensis*).

La planta produce racimos pequeños con gran número de dedos cortos, gruesos y rectos que dan al racimo una característica particular. Su pulpa es blanca o amarilla, suave, pastosa, muy dulce y con mucho aroma. La cáscara es muy delgada y la cutícula muy sensible a magulladuras, lo que dificulta su transporte a los mercados (Soto, 1990).

3.2. Grupo AAA.

De acuerdo con Soto (1990), éste grupo está constituido por varios subgrupos de bananos con alguna semejanza entre sí y la separación de éstos, requiere de la aplicación de una clave descrita por Simmonds (1973).

El subgrupo "Gros Michel", posee frutos delgados, en forma de cuello de botella (cinco veces, por lo menos, más

largos que anchos), marcadamente curvos y amarillo brillante a la madurez. Las vainas interiores son de un color verde o rosado pálido.

EL subgrupo "Cavendish" posee frutos con punta roma y son verdosos en la madurez. Las vainas interiores (especialmente en los retoños jóvenes), son de color rojo brillante. En este subgrupo tenemos por ejemplo al "Gran enano", y al "Pequeño enano".

EL subgrupo "Red", "Green Red", posee frutos gruesos (tres o cuatro veces más largos que anchos), sin curva o ligeramente curvados.

3.3 Grupo AAAA.

En éste grupo sólo se conoce un tetraploide que crece en forma natural, el cual se encuentra en la colección de Laloki en Nueva Guinea (Shepherd y Ferreira, 1982). Los demás tetraploides existentes son resultados de hibridaciones experimentales. El clon más conocido es el Bodles Altafort (IC-2 ó 1847) producido en Trinidad, del cruce de "Gros Michel" con el diploide "Pisang Lilin"; este clon es una planta de gran tamaño, altamente resistente a la "Enfermedad de Panamá", pero aunque sus frutos son cortos, tienen buen sabor y permiten un buen manejo (Simmonds, 1973).

3.4. Grupo AAB.

Los clones de éste grupo se caracterizan por presentar plantas robustas inmunes a la "Enfermedad de Panamá". Existe gran cantidad de clones de alguna importancia económica local. Sus frutos no son apetecidos para la exportación con excepción del subgrupo "Plantain", el cual según Simmonds (1973), se divide en tres tipos:

a. Eje masculino persistente, por lo general envuelto por remanentes de flores masculinas y brácteas.

(1). Tipo " French plantain ".

b. Eje masculino ausente:

(2). Tipo " Horn Plantain " (cuerno).

c. Eje masculino deciduo:

(3). "Falso cuerno".

3.5. Grupo ABB.

Es un grupo de plantas muy vigorosas, que se adaptan muy bien a condiciones ecológicas adversas, como resultado de la predominancia genética de *Musa balbisiana*. La planta tiene una coloración verde intensa en el sistema foliar, no presenta manchas o presenta muy pocas. El pseudotallo y las hojas son grandes y cubiertas de cera. La planta es

resistente a la "Enfermedad de Panamá" y tolerante a "Sigatoka negra". Es poco afectada por los nemátodos y altamente resistente al volcamiento por vientos (Soto, 1990).

Las plantas de este grupo producen racimos relativamente pequeños en proporción a su tamaño, cuyos frutos son cortos, rectos y muy angulosos, con una alta proporción de cáscara. La pulpa es amilacea y ligeramente ácida cuando madura. Las plantas de este grupo son posiblemente las más ampliamente distribuidas en el mundo, donde algunos clones como el "Saba" constituyen parte muy importante de la dieta de los habitantes de Asia. Los clones conocidos como "Guineas" se cultivan mucho en América Latina y se consumen ya sea verdes o maduros. Algunos son susceptibles a la enfermedad del "Moko" (*Pseudomonas solanacearum*), por lo que ha sido necesario su sustitución por el clon "Pelipita" resistente a dicha enfermedad (Soto, 1990).

3.6. Grupo ABBB.

Los bananos de este grupo son tetraploides naturales; los frutos son masivos, romos y grises, con una textura esponjosa y fibrosa, que suele ser agradable cuando se cocina. Este grupo no tiene importancia económica; el único clon conocido es el "Tiparot" o "Teparod" (Simmonds, 1973).

4. Botánica y morfología vegetal.

El banano es considerado una "hierba" gigante (Champión, 1968). Su altura varía entre 2-9 m.; posee un cormo basal, un pseudotallo compuesto de vainas foliares, una corona terminal de hojas (peciolo y lámina) por la que la inflorescencia emerge empujada desde la base del pseudotallo (Purseglove, 1981), (figura 1).

4.1. Sistema radical.

La raíz principal de la plántula muere rápidamente y es reemplazada por raíces adventicias, que son el único tipo de raíces producidas por plantas propagadas vegetativamente (Stover y simmonds, 1987).

Al principio las raíces son blancas y blandas, tomando más tarde una coloración amarillenta y ligeramente más oscuras conforme se hacen más viejas; su diámetro difiere según las variedades y puede ser de 5-8 mm. (Champión, 1968). Las raíces son producidas en grupos de cuatro sobre la superficie del cilindro central del cormo. Un cormo saludable produce de 200-400 raíces, la mayoría en la primera mitad del mismo. Las raíces primarias producen delgadas raíces laterales que poseen pelos radicales. Las raíces se extienden lateralmente 4-5 m., descendiendo hasta 75 cm., pero encontrándose la mayoría en los 15 cm. superiores,

formando un denso "colchón" superficial (Stover y Simmonds, 1987).

La diferenciación de las raíces prosigue hasta el momento en que el tallo verdadero se hace aéreo y la emisión de raíces cesa por lo tanto poco después de la floración (Champion, 1968).

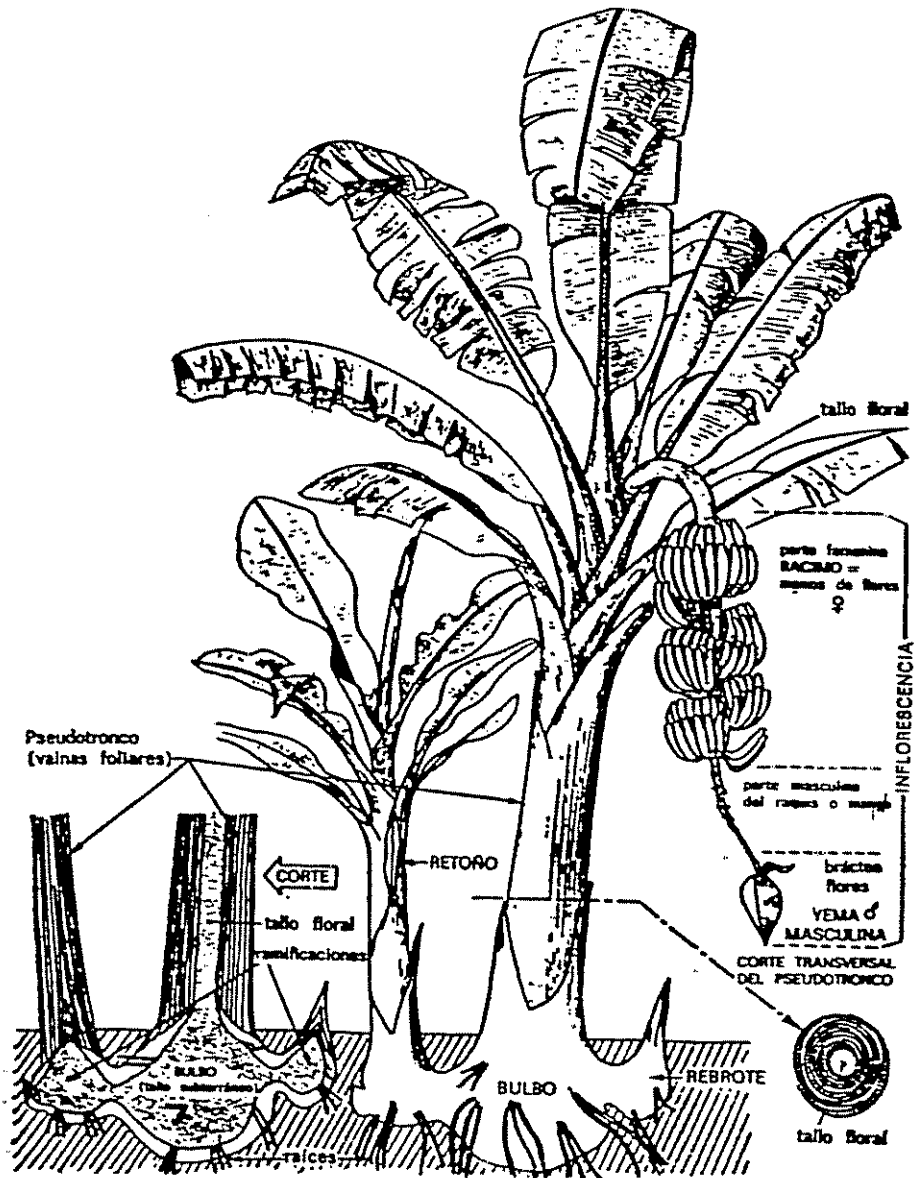


Figura 1. Vista esquemática de una planta de banano (Champion, 1962).

4.2. Tallo.

Las Musaceas poseen un tallo subterráneo o cormoso, con entrenudos extremadamente pequeños, cubiertos externamente con cicatrices foliares que rodean completamente el cormo; se diferencia internamente en cilindro central y córtex. El punto de crecimiento terminal o meristema es un domo aplanado, afuera del cual se forman las hojas en una sucesión en espiral; finalmente el meristema vegetativo se transforma en un meristema floral dando origen a la inflorescencia. (Stover y Simmonds, 1987).

4.3. Hojas.

Las hojas nacen en una espiral que se desenvuelve hacia la izquierda, con filotaxis de un tercio en los brotes jóvenes, cambiando gradualmente a cuatro novenos en las plantas maduras. Las primeras hojas producidas en los brotes son hojas escamosas, seguidas de hojas angostas, ensanchándose luego la lámina hasta que se producen hojas maduras aproximadamente a los 6 meses. Las vainas foliares están estrechamente empacadas para formar el pseudotallo (Purseglove, 1981).

La hoja se desarrolla como un cilindro enrollado. Empuja el centro del pseudotallo por elongación de la vaina foliar y emerge en el centro de la corona de hojas. Después

de emerger, la hoja se desenrolla, tomando 6 a 8 días para completar el proceso (Stover y Simmonds, 1987).

Una hoja adulta posee cuatro partes: la lámina o limbo con un apéndice que es una prolongación filiforme la cual sufre abscisión poco tiempo después de abrirse la hoja, la vaina, el peciolo y la nervadura central (Champion, 1968).

Los triploides tienen hojas más anchas y gruesas, estomas más grandes pero menos numerosos que los diploides (Stover y Simmonds, 1987).

4.4. Inflorescencia.

Después de siete a nueve meses de sembrado un hijo de una planta de banano, que a su vez tenía seis a ocho meses antes de la siembra, el punto de crecimiento en la base del corazón del pseudotallo se transforma en una inflorescencia. Las flores masculinas y femeninas son indistinguibles morfológicamente hasta que la inflorescencia alcanza 12 cm. de largo y se encuentra a 150 cm. de la base del pseudotallo (Purseglove, 1981).

La inflorescencia es una espiga compleja y consiste de un pedúnculo en el que las flores se encuentran arregladas en racimos nodales en dos filas de cojines transversos, cada uno sostenido por una bráctea ovalada y rojiza. Los racimos florales y brácteas nacen en espiral y no rodean al

pedúnculo. De 12 a 20 flores son producidas por nudo. Los primeros 5 a 15 nudos basales o manos producen flores femeninas. Los nudos distales producen flores masculinas (estaminadas) y pueden haber nudos intermedios o flores con estructura transicional que es neutra (Purseglove, 1981).

Las brácteas salen, como una diaria, poco antes que las flores sean funcionales. Las brácteas son normalmente deciduas y caen antes o seguidamente después que las flores permanecen abiertas por un día. En el "Cavendish Enano" y otros cultivares las brácteas son retenidas. Las brácteas arregladas en espiral se traslapan de tal manera que todas las brácteas y flores están encerradas y protegidas en una gran estructura bulbosa. Conforme las brácteas y flores se abren secuencialmente, el pedúnculo se alarga hasta que el racimo maduro alcanza 150 cm. Los frutos estan en el extremo basal, seguidos de un eje desnudo del que han caído las flores masculinas y brácteas (Purseglove, 1981).

4.5. Flores.

Las flores presentan un perianto zigomórfico con tépalo compuesto abaxial con tres lóbulos mayores y dos menores alternos y un tépalo menor libre; amarillo, crema o blanco, a veces con manchas rosadas. Las flores femeninas, miden 10 cm. de largo, poseen un ovario infero de tres lóculos bien

desarrollados, más largo que el perianto (figura 2). Los óvulos son numerosos en dos a cuatro hileras y tienen una placentación axial. El estilo termina en un estigma trilobulado. El perianto está constituido por cinco estambres. El ovario es persistente, pero ocurre absición del perianto, estambre y estilo que dejan una cicatriz que persiste en un extremo del fruto maduro (Purseglove, 1981).

Las flores masculinas tienen 6cm. de longitud, cinco estambres, con uno en posición adaxial; las anteras son largas y fijas basalmente. El ovario es pequeño y abortivo, con un estilo delgado. La flor entera sufre absición en la base del ovario (Purseglove, 1981).

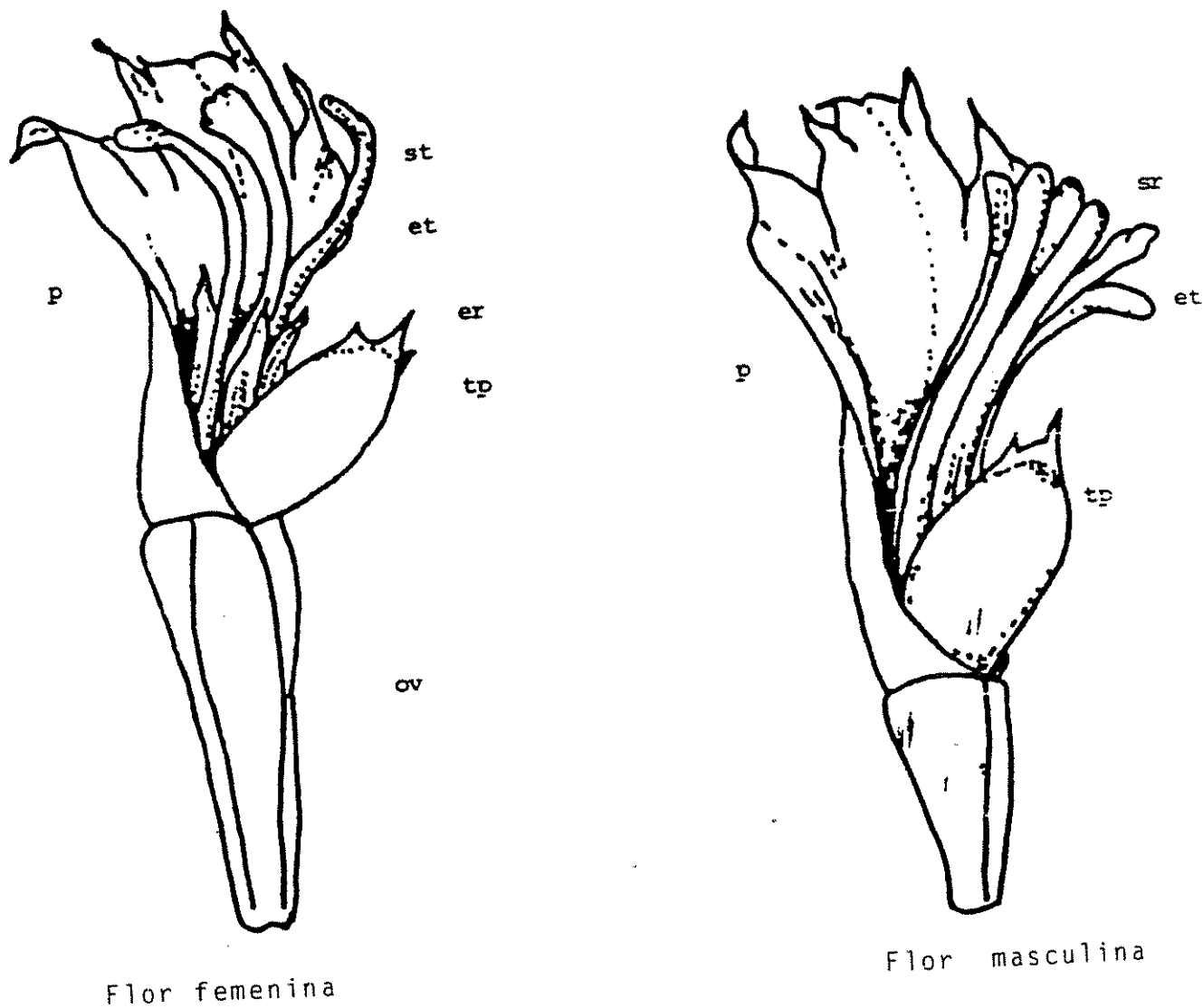


Figura 2. Flores del banano. st (stigma); str (estigma reducido); et (estambre); etr (estambre reducido); tp (tépallo libre); p (perigonio); ov (ovario).

4.6. Frutos.

El tiempo desde la aparición del racimo hasta la cosecha es de 90 días. En los parientes silvestres *M.acuminata* y *M. balbisiana*, la polinización es esencial para el desarrollo del fruto y los frutos maduros contienen una masa de semillas negras cubiertas de una pulpa dulzona. En los cultivares comestibles, la partenocarpia vegetativa resulta en la producción de pulpa comestible sin polinización. La pulpa se desarrolla del extremo exterior del lóculo y del hinchamiento de la septa y eje. La mayoría de los clones son femenino-estériles, como por ejemplo el sub-grupo Cavendish, y no producen semillas. Los óvulos se encojen en un inicio y se ven como pequeños puntos oscuros en los frutos maduros. Muy pocos cultivares, como por ejemplo el "Gros Michel" son ligeramente femenino-fértiles y ocasionalmente aparecen semillas, si son polinizados por un diploide masculino fértil (Stover y Simmonds, 1987).

4.7. Semillas.

Los triploides comestibles no producen semillas cuando son cultivados en poblaciones puras, algunos son completamente femenino-estériles; otros producen ocasionalmente semilla cuando hay una fuente de polen viable disponible. Los diploides silvestres forman muchas semillas

después de la polinización. Los diploides partenocárpicos producen cantidades variables de semillas. Las semillas tienen como 5 mm. de diámetro, son subglobosas o angulares, muy duras, endospermicas, con un diminuto embrión cerca del micrópilo (Purseglove, 1981).

5. Citogenética de los bananos silvestres.

El conteo cromosómico aunque resulta un poco difícil debido al diminuto tamaño de estos cromosomas, se realiza en puntas de raíces jóvenes que se encuentren en el proceso de mitosis (Simmonds, 1962).

Sin embargo Simmonds (1962), opina que la técnica del "squash " en la cual se usa la 8-hidroxiquinolina, sugiere que el problema de la determinación cromosómica no es tan complicada como parecía en un principio. Esta técnica ha sido descrita por Shepherd (1959).

La meiosis tiene lugar en la célula madre del polen alrededor de la bráctea número 25, antes de que se presente la floración, lo cual corresponde a un lapso alrededor de unas tres semanas entre la meiosis y la antesis, que puede ser más corto en ciertas especies (Dodds y Simmonds, 1946).

En *Musa*, la célula madre del polen es realmente enorme en relación a los pequeños cromosomas y el huso. Los granos de polen tienen un diámetro de 90 a 100 micrones. Por otra parte la célula madre del polen es mucho más grande que la célula madre de la megaspora (Simmonds, 1962).

Según Fahn (1978), en las angiospermas, el gametófito masculino maduro consiste de tres células que provienen de dos divisiones mitóticas que ocurren en el grano de polen. Antes de la primera mitosis, el núcleo de la microspora (el grano de polen inmaduro) se adosa junto a la pared. De la primera división resultan dos células, la vegetativa y la generativa.

De acuerdo con Mephram y Lone (1970), la célula generativa tiene inicialmente una pared de calosa. Poco después de su formación, ésta se separa de la pared del grano de polen y abandona su envoltura de calosa, y se rodea del citoplasma de la célula vegetativa. En este estadio se ha observado que adopta una forma oval o lenticular. Hacia este momento es cuando el grano de polen se "derrama" de la antera.

Maheshwari (1950), opina que aunque en muchas plantas la célula generativa se divide para formar los dos núcleos

gaméticos antes de la dehiscencia de la antera, en otras especies la célula generatriz no se divide hasta haber penetrado en el tubo polínico (figura 3).

El proceso de la megaesporogénesis ha sido descrito por Dodds (1945). Este autor afirma que el saco embrionario de los bananos silvestres es del tipo monospórico, con ocho núcleos, referido usualmente como normal. Además afirma que la meiosis se presenta en las flores femeninas más viejas, en el momento en que el racimo sale del pseudotallo y, unos cinco a siete días después, los estigmas son receptivos.

Bouharmont (1963), coincide con el autor anterior y en un estudio de la especie *Musa acuminata* ssp *burmannica*, opina que el saco embrionario de las musaceas tiene generalmente forma de cono. Presenta tres células uninucleadas en la punta del cono y dos núcleos polares en la base. La oosfera está vacuolizada, su núcleo es pequeño y está en la parte media o profunda de la célula. Las dos sinérgidas están al lado de la oosfera, ellas son un poco más pequeñas y su citoplasma es muy denso en la la mitad superior. Los dos núcleos polares son más voluminosos y su nucléolo es muy grueso; ellos están unidos y situados al fondo del saco embrionario, en el agujero central o en una proximidad de

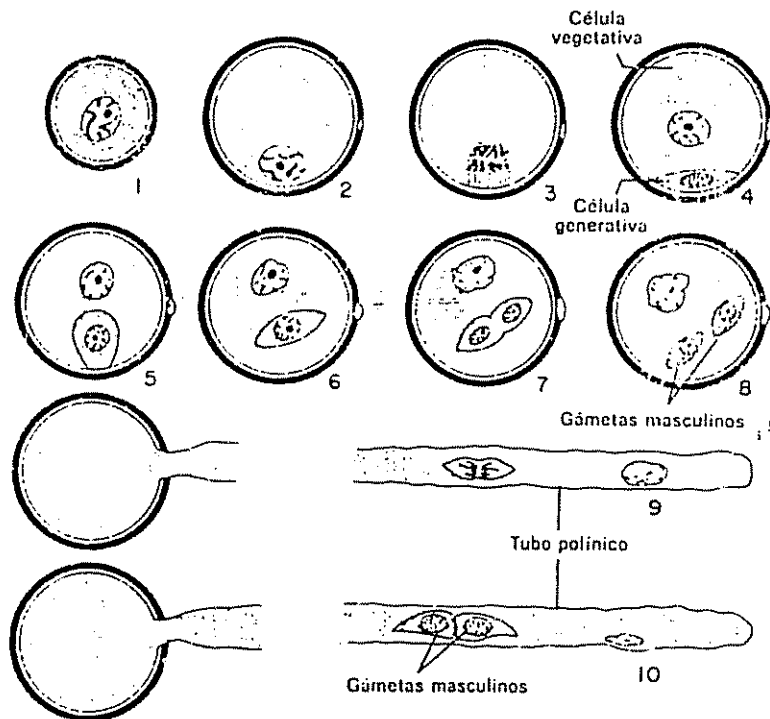


Figura 3. Tipos de desarrollo de los gametófitos masculinos en las angiospermas (Maheshwari, 1950).

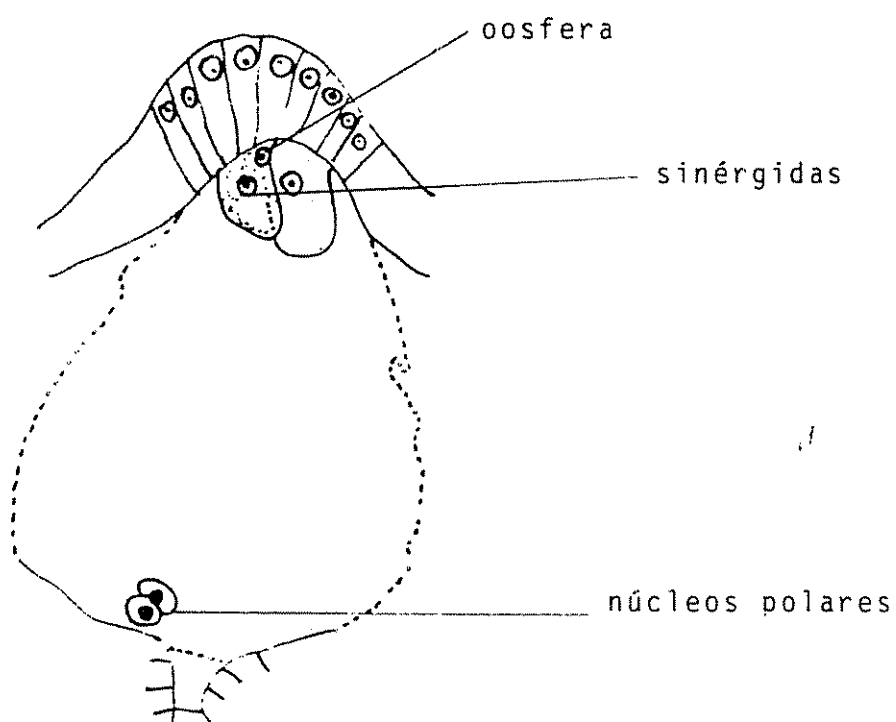


Figura 4. Saco embrionario de *Musa* sp, tipo monospórico (Bouharmont, 1963).

éste (figura 4). No hay ninguna huella de las antípodas al momento de la floración, aunque Dodds (1945) observó tres antípodas en el agujero mediano, en el caso de un clon comestible de *Musa acuminata*.

6. Polinización de los bananos silvestres.

Los eventos subsecuentes a la polinización fueron descritos por Dodds (1945). Según este autor los tubos polínicos crecen hacia abajo del estilo en unas 12 horas, con un promedio de alrededor de tres milímetros por hora.

Bouharmont (1963), afirma que la penetración del tubo polínico provoca un oscurecimiento de toda la parte superior y de toda la región donde se encuentran los núcleos polares. Cuando el citoplasma se vuelve más claro, la fusión de la oosfera con uno de los núcleos machos está terminada y el cigoto posee uno o dos núcleos (figura 5). Las sinérgidas han desaparecido o están prácticamente destruidas. En el fondo del saco embrionario, una masa de citoplasma muy coloreable, desprovista de pared contiene tres nucléolos del mismo tamaño o dos gruesos y uno pequeño.

El núcleo endospermico se comienza a dividir casi en seguida. El cigoto se desarrolla más tardíamente, y el

primer proembrión pluricelular ha sido observado en frutos de 13 días. Esta división es sin embargo variable y la célula es aún única en algunos sacos embrionarios más viejos (Bouharmont, 1963).

El último comentario de Bouharmont ha sido expuesto por Dodds (1945), aseverando que en fertilizaciones que siguen su curso normal, el cigoto permanece como una célula individual por un período de unas cuatro semanas. Además opina que alrededor de 12 horas después de la fertilización, se forma un endosperma triploide cuatrinucleado y dos días después existen de 20 a 40 núcleos.

La mayoría de las subespecies de *Musa acuminata* poseen de 100 a 200 óvulos por ovario, aunque en las de *Musa balbisiana* se encuentran más (300 a 400). De allí que siempre halla pérdida de óvulos en el desarrollo, de modo que la fertilidad de las semillas nunca es igual al número de óvulos (Simmonds, 1962).

En semillas de 25 días, el proembrión es una pequeña masa pluricelular indiferenciada y alargada que mide 65 micras de largo y 35 micras de ancho; a los 40 días, el embrión mide 110 micras de largo y 40 micras de ancho, y emerge parcialmente del hueco de la corona micropilaria. A

los 55 días, su tamaño es muy grande y variable el cual puede variar entre 120 y 250 micras de largo y de 80 a 170 micras de ancho. Muestra un comienzo asimétrico siguiendo la orientación de la copa, la zona meristemática es terminal y globosa o depositada lateralmente (Bouharmont, 1963).

En las semillas de 62 días, el embrión se fija a la corona nucelar por el suspensor y se ensancha en la cavidad delimitada por el collar micropilarario (cavidad embrionaria). Es alargado y más o menos cilíndrico, redondeado en la cima o terminando en punta (Bouharmont, 1963), (figura 6).

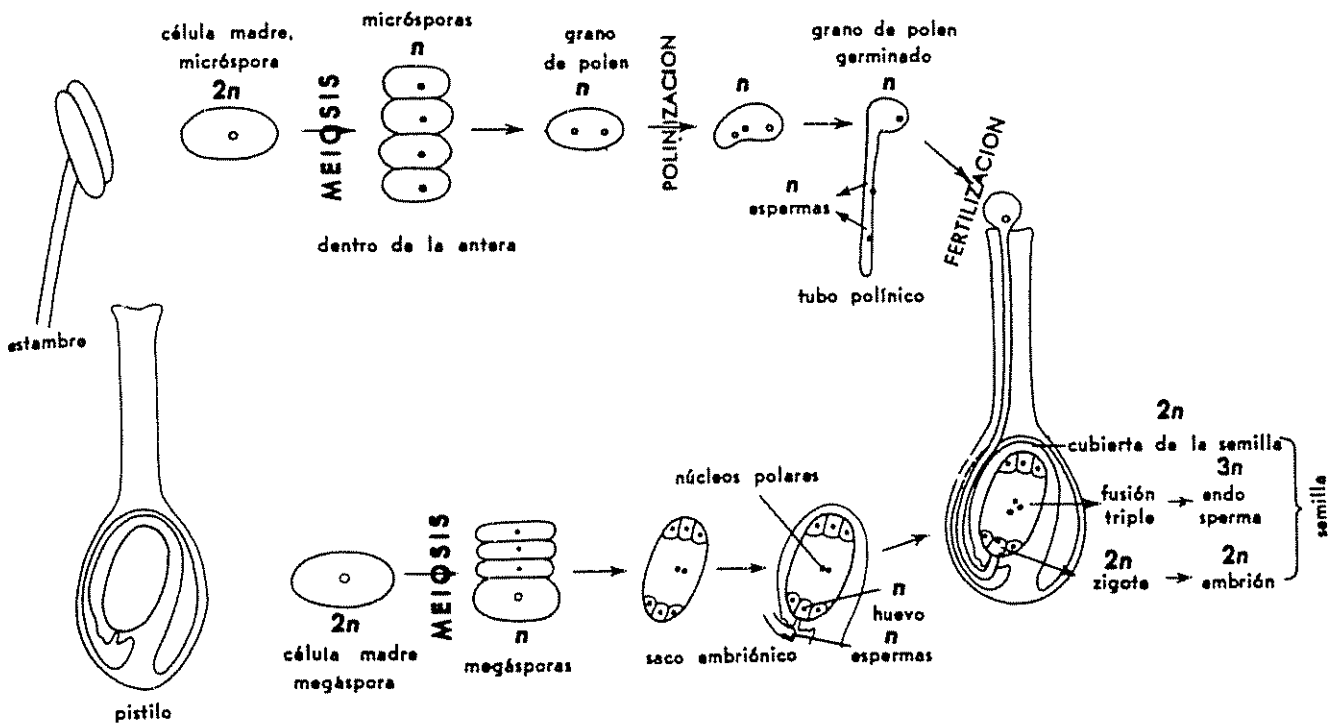


Figura 5. Procesos en la reproducción de una semilla. Empezando con las esporas células madre en las anteras y en los óvulos, se sucede una serie de eventos que culminan en la fertilización y formación final de la semilla (Poehlman, 1983).

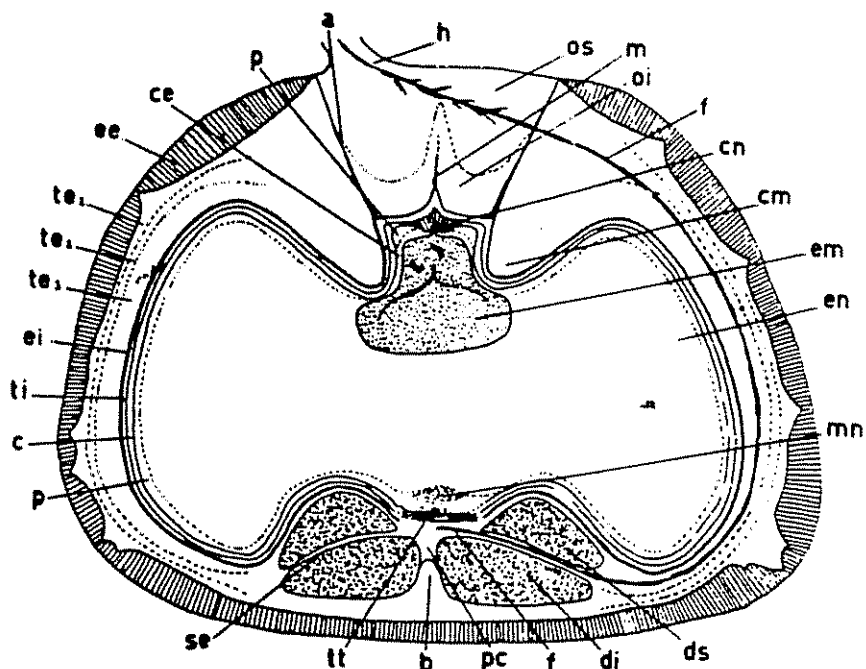


Figura 6. Corte esquemático de una semilla madura de *Musa ssp.* ee: epidermis exterior (abaxial) del tegumento externo, te1, te2, te3: capas diferenciadas del tegumento externo; ei: epidermo interior del tegumento externo; ti: tegumento interno; c: cutícula del nucelo; p: restos del perisperma; en: endosperma; a: zona de absorción; h: hilo; f: haz; os: parte poco diferenciada del opérculo; oi: parte inferior muy dura del opérculo; m: rastro del micrópilo; cn: gorro nucelar; ce: cavidad embrionaria; cm: collar micropilar; em: embrión; mn: restos de la masa nucelar axial; tt: tejido de transición entre el nucelo y la chalaza; ds: disco superior de la chalaza; di: disco inferior; pe: parénquima situado en el centro de los discos; b: cojín esclerificado en el centro del disco inferior, (Bouharmont, 1963).

III. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, CATIE, Turrialba, Costa Rica; con la colaboración del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de México, Centroamérica y Panamá (DIRSA), extensión de San José, Costa Rica. El estudio se realizó durante el periodo comprendido entre Octubre de 1990 y Octubre de 1991.

EL material vegetal se obtuvo de la colección de Musaceas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, utilizándose la subespecie *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* y la subespecie *Musa balbisiana* tipo TANI.

1. Pruebas preliminares.

1.1. Microesporogénesis y forma de la tétrade.

Con el fin de degradar la exina de los granos de polen, y permitir una mejor observación al microscópio, se tomaron flores masculinas con sus anteras y se pusieron en una solución que contenía, seis partes de etanol absoluto, tres partes de cloroformo, una parte de ácido acético. Se añadió una gota de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (solución saturada), por cada 15 ml.

de solución. El tiempo de maceración en la solución para degradar la exina varió según la edad del polen. Así las flores que salieron al levantarse las brácteas 40 a 36 fueron dejadas por un día y las de las brácteas 37 a 22 permanecieron tres días, debido a que la exina es más gruesa en estos últimos estadios de desarrollo del polen.

Para preservar sus estructuras, se fijaron en FAA (ocho partes de etanol 70^o, una parte de formalina 37%, una parte de ácido acético glacial).

Para la observación al microscopio se tomaron las anteras y se pusieron en un portaobjetos, luego se les añadió el colorante carmin-acético (en exceso) y con un bisturí se segmentaron y aplastaron para permitir la salida de los granos de polen. Finalmente se les colocó un cubreobjetos y con la ayuda de un mechero se calentó suavemente el portaobjetos para mejorar la tinción.

1.2 Viabilidad y germinación del polen.

Con el fin de evaluar la viabilidad y la capacidad de germinación del polen de las subespecies *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* y *Musa balbisiana* tipo TANI, antes y después

de la irradiación con rayos gamma, se realizaron las pruebas siguientes:

La primera prueba fue la determinación de la viabilidad mediante el uso de diferentes tinciones. Para el polen de la subespecie *Musa acuminata ssp burmannicoides*, se utilizaron tres tinciones: colorante de Alexander (Anexo 1), Azul de Algodón y Fluoresceína (Anexo 2). Debido a los resultados encontrados en los ensayos anteriores, para el polen de la subespecie *Musa balbisiana* tipo TANI solo se utilizaron el colorante de Alexander y el Azul de Algodón.

Luego se probaron unos medios de cultivo para la determinación de la capacidad germinativa del polen. La mayoría de los medios han sido utilizados en otras plantas, y estos contenían en orden de importancia: sacarosa, ácido bórico; también se ajustaron diferentes grados de pH. Las diferentes combinaciones probadas se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Factores y niveles utilizados para la germinación del polen de la especie *Musa acuminata ssp burmannicoides*, en medio líquido.

Factor	Niveles	0	1	2
Sacarosa		1%	5%	9%
Acido Bórico		0,01%	0,02%	0,03%
pH		6,0	6,5	7,0

Además se utilizó un medio sólido de germinación, sugerido por la guía de histología del CIRAD, con modificaciones en la concentración de agar y sacarosa (Anexo 3).

Se probó también el método de germinación *in vivo* sobre los estigmas, el cual consistió en tomar en el campo flores femeninas y masculinas, llevarlas al laboratorio, y ahí depositar el polen de las anteras sobre los estigmas de las flores femeninas, poniendo estas últimas en cajas petri y colocándolas a una temperatura de 28°C por 24 horas. Posteriormente los estigmas fueron teñidos con el colorante " Z " (Anexo 4) y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia con un filtro Nikon Bv-2A de excitación Ex400-440 y Barrido BA 470.

1.3. Variables evaluadas.

La viabilidad del polen se evaluó a través de coloraciones (Cuadro 2), mediante el conteo al microscopio en 10 campos ópticos, contando 100 granos de polen en cada uno.

Para los experimentos de germinación del polen la variable evaluada fue el porcentaje de germinación, por medio del conteo en campos ópticos.

Cuadro 2. Tinción diferencial para evaluar viabilidad del polen.

Tinte	Viable	No Viable
Azul de Algodón	Azul	Incoloro
C. Alexander	Rojo	Verde
Fluoresceína	Fluorece	No fluorece

1.4. Análisis estadístico.

En la determinación de la viabilidad del polen de la subespecie *Musa acuminata ssp burmannicoides*, por medio de colorantes, se utilizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos y 5 repeticiones.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}.$$

Donde:

μ = media general.

Y_{ij} = porcentaje de germinación.

τ_i = efecto del colorante.

ϵ_{ij} = error experimental.

El análisis de varianza se efectuó de la siguiente manera:

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	
Colorante (C)	(C-1)	2
Error (E)	C(r-1)	12
Total (N)	(N-1)	14

En la determinación de la viabilidad del polen de la subespecie *Musa balbisiana* tipo TANI, por medio de colorantes se utilizó una prueba "T" de Student.

El análisis estadístico para la determinación de los niveles de los factores utilizados en la germinación del polen se realizó mediante un arreglo factorial 3^3 , en bloques incompletos, lo cual resultó en un total de 27 tratamientos. Se realizaron dos repeticiones (2 x 27) lo que lleva a 54 el número de unidades experimentales. En este diseño estadístico la interacción triple se encuentra confundida con los días (bloques).

Las fuentes de variación y grados de libertad para el análisis de varianza de este experimento son los siguientes:

F.V	G.L
Bloq ———— Rep	1
Bloq/rep = SPA(parte)	4

S	2
P	2
A	2
S*P	4
S*A	4
P*A	4
SPA(parte)	4
Error	26
Total	53

2. Conservación de polen.

Debido a que la fuente de Cobalto 60 utilizada en el experimento, se encontraba en la ciudad de San José, fué necesario realizar un ensayo de conservación de polen con el fin de determinar el tiempo comprendido entre la colecta del polen y la polinización. Para esta evaluación se empleó la técnica de germinación sobre los estigmas utilizando dos tratamientos: uno consistía en dejar el polen en el laboratorio a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) por 48 horas, y el otro en dejar el polen por 48 horas a $9^{\circ}\text{C} \pm 1$ en un refrigerador. Este ensayo también incluyó un testigo, el cual fué puesto a germinar inmediatamente.

2.1 Variables evaluadas.

En este experimento la variable evaluada fue el porcentaje de germinación, a través del conteo en campos ópticos, ya que el interés era conocer en que medida se

conservaba la capacidad de germinar del polen bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

2.2 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de esta etapa se utilizó una prueba "T" de Student.

3. Irradiación de polen.

La radiación utilizada fue la radiación gamma, emitida por una fuente de Cobalto 60. Esta fuente, da una dosis de 10 kr en 21 minutos.

El polen fue sometido a diferentes dosis de radiación gamma, para lo cual se tomaron las flores masculinas al momento de la antesis y se pusieron en recipientes de plástico transparente (majentas), las cuales se cubrieron con papel de parafina y se introdujeron en la fuente de Cobalto 60, para aplicarle una dosis específica. Primeramente se utilizaron dosis de 10 kr, 20 kr, 30 kr, 40 kr, 50 kr, 60 kr, 70 kr, 80 kr, 90 kr, 100 kr. Debido a los resultados obtenidos con las dosis anteriores, se acortó el intervalo y se utilizaron dosis de 3 kr, 5 kr, 7 kr, 8 kr, 10 Kr.

Los periodos de tiempo requeridos para alcanzar las diferentes dosis de radiación se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tiempos necesarios para alcanzar las diferentes dosis de radiación.

TIEMPO	DOSIS
6,3 min	3 Kr
10,5 min	5 Kr
14,7 min	7 Kr
16,8 min	8 Kr
21,0 min	10 Kr
42,0 min	20 Kr
63,0 min	30 Kr
84,0 min	40 Kr
105,0 min	50 Kr
126,0 min	60 Kr
147,0 min	70 Kr
168,0 min	80 Kr
189,0 min	90 Kr
210,0 min	100 Kr

3.1 Variables evaluadas.

Se evaluó el porcentaje de germinación, con el fin de establecer la influencia de la dosis de radiación sobre la germinación del polen y sobre la capacidad de polinización de éste.

4. Polinización con polen irradiado.

Una vez que se irradió el polen con las dosis descritas anteriormente, se procedió a polinizar el mismo día con polen fresco y al siguiente día, con polen conservado a 9°C.

Para esta prueba se utilizaron un total de 12 plantas, las cuales produjeron de 7 a 10 manos cada una. A cada mano se le aplicó un tratamiento diferente (o sea, polen con diferente dosis de irradiación). Además en cada planta se tuvo una mano testigo polinizada con polen sin irradiar y otra mano sin polinizar.

Para evitar posibles alteraciones ocasionadas por el polen de otras plantas, traído por insectos (principalmente abejas), cada racimo se cubrió con una bolsa (tela tipo malla) de polinización antes de que las flores femeninas se abrieran; esta se mantuvo a lo largo de todas las polinizaciones (figura 7).

Para determinar si los tubos polínicos del polen sometido a diferentes dosis de radiación podían entrar en contacto con los óvulos, se tomaron muestras de flores femeninas a las 48 horas de haberse polinizado y se tiñeron con el colorante "Z". Debido al tamaño y grosor de éstas,



Figura 7. Bolsa de polinización utilizada para evitar la entrada de polen extraño.

fueron aplastadas con un "squash" para luego ser observadas al microscópio de fluorescencia utilizándose el mismo filtro que se utilizó para el conteo de germinación sobre los estigmas.

4.1 Variables evaluadas.

Para determinar si la semilla se desarrollaba al ser polinizada con polen irradiado, se evaluó el tamaño de la semilla a los 15, 25, 35, 45, y 55 días después de la polinización.

5. Estudio histológico.

Con el fin de observar el grado de desarrollo que presentaban las semillas provenientes de las diferentes polinizaciones realizadas, se hicieron muestreos a los 15, 25, 35, 45, y 55 días después de efectuada la polinización.

Estas muestras fueron fijadas en una solución de FAA (formalina, a.acético, etanol) durante dos días, y deshidratadas en una serie ascendente de alcohol etílico (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%), a razón de una hora en cada alcohol. Se pasaron luego a una mezcla (1:1) de

alcohol de 100 y tolueno durante 30 minutos. Seguidamente se sumergieron dos veces en tolueno puro (una hora cada vez). Posteriormente fueron colocadas en una mezcla (1:1) de tolueno y parafina durante 30 minutos, para hacerles finalmente tres cambios en parafina pura (una hora cada vez).

Una vez infiltradas en bloques de parafina, las muestras se montaron en bloques de madera para ser cortadas. Los cortes fueron de nueve micras de grosor, utilizando un micrótopo de rotación. Dichos cortes fueron montados en portaobjetos y teñidos con la técnica de cuádruple coloración (CIRAD, 1989) para su posterior observación al microscopio de luz.

6. Rescate de embrión.

Se realizaron rescates de embrión a los 45, 55 y 80 días de edad, debido a que no se sabía si las semillas polinizadas con polen irradiado podrían lograr el desarrollo del embrión completamente maduro. Por lo cual, para los 45 y 55 días se utilizó un medio MS (Anexo 5), con una composición hormonal ajustada por Escalant y Teisson (1989). Este contenía picloram (2 mg/l), para estimular la formación de callos. Al formarse callos, estos se cambiaron a un medio con 0,5 mg/l de picloram para estimular la formación de embriones somáticos; dichos embriones se cambiaron a un medio de

germinación: MS con AIA (2 mg/l) y BAP (0,5 mg/l) el cual también se utilizó para los embriones maduros de 80 días.

6.1. Variables evaluadas.

Para los embriones inmaduros se evaluó el porcentaje de formación de callos. Para los embriones maduros se evaluó el porcentaje de germinación.

7. Microscopía electrónica.

Los granos de polen de ambas subespecies fueron puestos a germinar sobre los estigmas (ver materiales y métodos).

Después de 24 horas de haberse efectuado la polinización, se tomó una muestra de este material y se procesó para microscopía electrónica de barrido. Para ello, los estigmas fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 2,5% en buffer de fosfatos durante tres horas. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno en buffer de fosfatos, se hizo una postfijación en tetraóxido de osmio (1%) en buffer de fosfatos (una hora), realizándose otros tres lavados de 10 minutos cada uno en buffer de fosfatos. Posteriormente se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol etílico

(500, 700, 800, 900, 950, 1000, 1000). Finalmente se secaron por punto crítico y finalmente se recubrieron con oro.

8. Coloración de ADN.

En esta etapa se utilizaron muestras de polen irradiado a diferentes dosis (3 Kr, 5 Kr, 7 Kr, 8 Kr, 10 Kr, 20 Kr, 30 Kr, 50 Kr) y un testigo. Se procedió a teñir granos de polen y polen germinado con el colorante DAPI (Anexo 6), el cual según CIRAD (1989), hace que fluoresca (blanco brillante) el ADN de los núcleos del polen. Las observaciones se realizaron al microscopio de fluorescencia utilizándose un filtro Nikon Uv-2A de excitación Ex 330-380 y barrido BA 420.

Nuestro interés era ver como se afectaba la organización de la cromatina, con las diferentes dosis de radiación y evaluar o predecir la capacidad de fertilización del polen irradiado, según la dosis que se le aplicara.

9. Cariotipo.

Para determinar el nivel de ploidía, se utilizó el método simplificado de conteo de cromosomas de Shepherd (comunicación personal). Este método consiste en tomar las puntas de las raíces más jóvenes y realizar un pretratamiento con 8-Hidroxiquinolina por 6 horas, para detener las mitosis

en el estadio de metafase. Se transfirieron luego por 18 horas a una solución fijadora (una parte de alcohol 950, cuatro partes de ácido acético glacial, cinco partes de agua destilada). Posteriormente se realiza la tinción y "squash" en orceina al 2% en lactofenol (partes iguales de: ácido láctico, fenol, glicerol, y agua). La observación se realiza al microscopio de luz con el objetivo de inmersión (100X).

IV. RESULTADOS

1. Pruebas preliminares.

En esta investigación se realizaron algunas pruebas con el polen de la especie *Musa acuminata* subespecie *burmannicoides* y algunas con *Musa balbisiana* tipo TANI.

1.1. Microesporogénesis y forma de la tétrade.

Los resultados del estudio de la microesporogénesis se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Microesporogénesis del diploide *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*.

Estadio	Célula madre	Meiosis	Tétrade	Uninucléado	
				centro	polo
Bráctea	40-37	36	35-33	32-29	28-22

En este estudio se pudo observar los diferentes estadios por los que pasa el polen de la subespecie *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* en el proceso de microesporogénesis, con excepción del estadio binucleado, debido a la presencia de una capa de exina muy gruesa, la cual no se pudo degradar lo suficiente. Pero de acuerdo a lo observado, el proceso de microesporogénesis se desarrolla normalmente (figura 8 y 9).

En un recuento de las diferentes formas de la tétrade, se obtuvo un promedio de 76,1% de tétrades esféricas, sobre los tres estadios (brácteas 33, 34, 35) en los cuales se da la formación de tétrades. Este dato es muy importante puesto que según Dessauw (1987), existe una correlación positiva ($r=0.98$) muy alta entre la tasa de formación de tétrades esféricas y la fertilidad polínica. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Recuento de las diferentes formas de tétrade encontradas.

Bráctea	Tétrade esférica	Tétrade lineal	Tétrade en T	Porcentaje tétrade esférica
35	74	14	13	73,2
34	81	12	11	77,8
33	56	10	6	77,0
Total	211	36	30	76,1

1.2. Viabilidad del polen.

Para la prueba de la viabilidad del polen de la especie *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*, los resultados se agrupan en el cuadro 6. El análisis de estos resultados con el proc GLM de SAS, nos dice que existe diferencia altamente significativa ($PR>0,0001$) entre los tratamientos, presentando medias de 92,0% para la fluoresceína, 61,1% para el azul de

algodón, 59,0% para el colorante de Alexander. Estos datos fueron sometidos a la transformación arcoseno $\sqrt{}$, pero las diferencias y coeficientes de variación no tuvieron un cambio substancial.

Cuadro 6. Porcentajes de germinación del polen de *M.acuminata* ssp *burmannicoides*, estimados a través de diferentes colorantes.

Colorante	REPI	REP2	REP3	REP4	REP5
Azul de algodón	62,9	62,0	55,9	62,2	62,9
C.Alexander	51,4	42,9	71,0	69,3	60,7
Fluoresceína	90,0	99,0	91,0	92,0	88,0

Una prueba de Duncan, realizada a estos datos reveló que no existe diferencia estadística entre los resultados obtenidos con el colorante de Alexander y los que se obtuvieron con el azul de algodón. Sin embargo, la diferencia observada con el uso de la fluoresceína es significativa con respecto a los otros dos colorantes (cuadro 7).

Cuadro 7. Medias aritméticas y prueba de Duncan del experimento de tinción del polen de *M.acuminata* ssp *burmannicoides*, expresadas en porcentaje.

Colorante	Media	D.std	Grupo Duncan
Azul de algodón	61,1	2.9	B
C.Alexander	59,0	11.9	B
Fluoresceína	92,0	4.1	A

Se realizó una prueba de tinción parecida a la anterior, sobre el polen de la especie *Musa balbisiana* tipo TANI, utilizada como padre en fecundaciones sobre *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*. En este caso se realizó una prueba "T" de Student y solamente se utilizaron el colorante de Alexander y el azul de algodón. La fluoresceína no se utilizó en este ensayo ya que en la prueba anterior no dió resultados satisfactorios y acordes con la germinación real del polen. Los resultados expresados en porcentajes se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Porcentajes de germinación del polen de *Musa balbisiana* tipo TANI, estimados a través de colorantes.

Colorante	REPI	REP2	REP3	REP4	REP5
Azul de algodón	75,0%	52,5%	60,6%	86,5%	83,7%
C.Alexander	82,6%	91,8%	54,3%	93,5%	73,9%

En este caso también se encontró que no había diferencia significativa en los resultados obtenidos con el colorante de Alexander y el azul de algodón. Desde un punto de vista estadístico, la probabilidad de obtener un valor de $f=1,18$, es muy alta (0,8755), lo cual indica que las varianzas no difieren. Entonces se utilizó la prueba "T" de varianzas iguales, o sea que $Pr>T0,4590$ por lo tanto las medias son iguales. Estos resultados se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Medias aritméticas y probabilidades en el experimento de tinción del polen de *Musa balbisiana* tipo TANI.

Colorante	Media	D.std	P>T
Azul de algodón	71,6	14.7	0,4590
C.Alexander	79,2	15.9	

1.3. Germinación del polen.

En los experimentos de germinación del polen *in vitro* de la subespecie *Musa acuminata ssp burmannicoides*, en los que se variaron los factores: sacarosa, ácido bórico y pH, sólo se obtuvo respuesta en el arreglo: sacarosa(9%), ácido bórico(0,02%), Ph(7,0). Esta respuesta fue de 20% de germinación.

Con la combinación de estos tres factores en las proporciones antes indicadas, se modificó el medio de

germinación del CIRAD, (1989); como se muestra en el anexo 3. El porcentaje de germinación así obtenido fue de 23,5%, lo cual no representó un aumento importante (figura 10).

En el caso de germinación sobre los estigmas, del polen de *M.acuminata ssp burmannicoides*, se obtuvo un porcentaje de germinación de 59,6%. Al cotejar este resultado con los que se obtuvieron en la prueba de viabilidad por colorantes, se observa que para el polen de *Musa acuminata ssp burmannicoides*, tanto el azul de algodón (61,1%), como el colorante de Alexander (59,0%), tienen una muy buena aproximación a la realidad.

Para el polen de *Musa balbisiana* tipo TANI, el porcentaje de germinación sobre los estigmas fue de 56,7%. Esta aproximación no es tan exacta, pero se debe tomar en cuenta que todas las pruebas de germinación se hicieron sobre estigmas de *Musa acuminata ssp burmannicoides*, lo que pudo haber alterado el porcentaje de germinación, puesto que según Simmonds (1987), las condiciones interespecíficas presentan diversos grados de incompatibilidad entre el estigma y el polen.

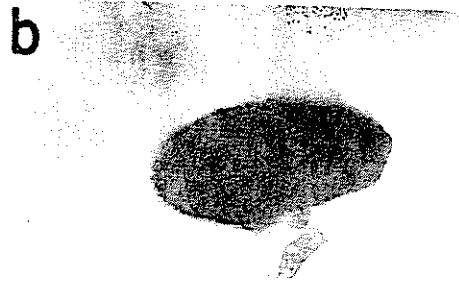
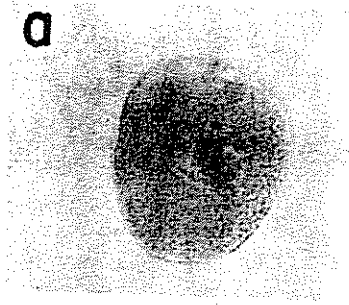


Figura 8. Microesporogénesis. a. Célula madre; b. Meiosis.

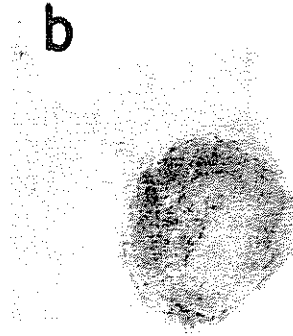
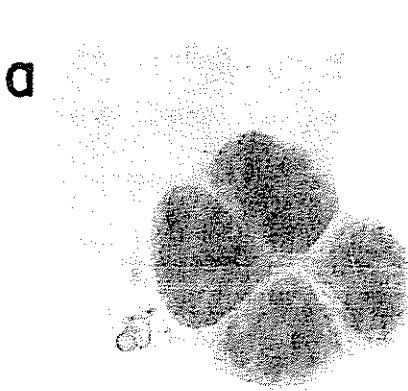


Figura 9. Microesporogénesis. a. Tétrade esférica; b. Estado uninucleado.

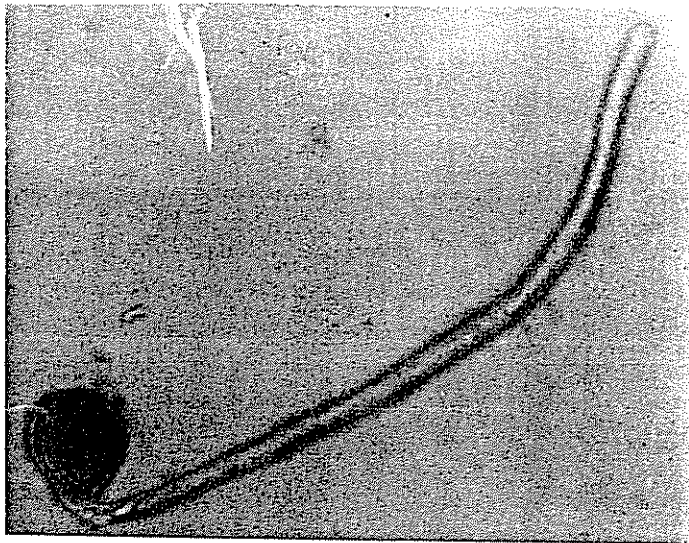


Figura 10. Polen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* germinando *in vitro*.

2. Conservación de polen.

Las pruebas efectuadas para medir la germinación de los granos de polen después de su conservación a diferentes temperaturas, dieron un resultado de 50% de germinación sobre los estigmas para la temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) y de un 57% de germinación para la temperatura de $9^{\circ}\text{C} \pm 1$; los datos de este experimento se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la prueba de conservación de polen.

	25°C	9°C
	Germinación (%)	Germinación (%)
Estigmas 1	72,1	53,6
Estigmas 2	59,9	40,7
Estigmas 3	19,0	76,4
Promedio	50,0	57,0

El análisis estadístico de este experimento demuestra que no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos de temperatura (cuadro 11).

Cuadro 11. Medias aritméticas y probabilidades del experimento de conservación del polen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*.

Temperatura	Media	P>T
25°C	50,0	0,7489
9°C	57,0	

3. Irradiación de polen.

Los resultados obtenidos en la germinación del polen irradiado, fueron un tanto variables para las diferentes dosis utilizadas. Sin embargo, el polen germinó a cualquiera de las dosis que recibió (figura 11). Se estableció que tanto el polen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* como el de *Musa acuminata* tipo TANI, puede germinar después de ser sometido a una radiación considerada como muy alta (100 Kr). Esto ha sido comprobado en Tabaco por otros autores como Pandey (1980). Los porcentajes de germinación obtenidos se muestran en el cuadro 12 (figura 12) y el cuadro 13 (figura 13).

Cuadro 12. Germinación sobre los estigmas del polen de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*, sometido a diferentes dosis de radiación gamma.

Dosis	porcentaje de germinación
Testigo	59,6
10 Kr	66,8
20 Kr	65,2
30 Kr	43,2
40 Kr	66,6
50 Kr	26,1
60 Kr	69,4
70 Kr	54,6
80 Kr	39,6
100 Kr	45,6

Cuadro 13. Conteo de polen germinando de *Musa balbisiana* tipo TANI sobre estigmas de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*.

Dosis	porcentaje de germinación
10 Kr	27,0
20 Kr	61,4
30 Kr	62,0
40 Kr	27,5
50 Kr	45,0
60 Kr	61,5
70 Kr	27,0
80 Kr	38,0
90 Kr	34,4
Testigo	56,7

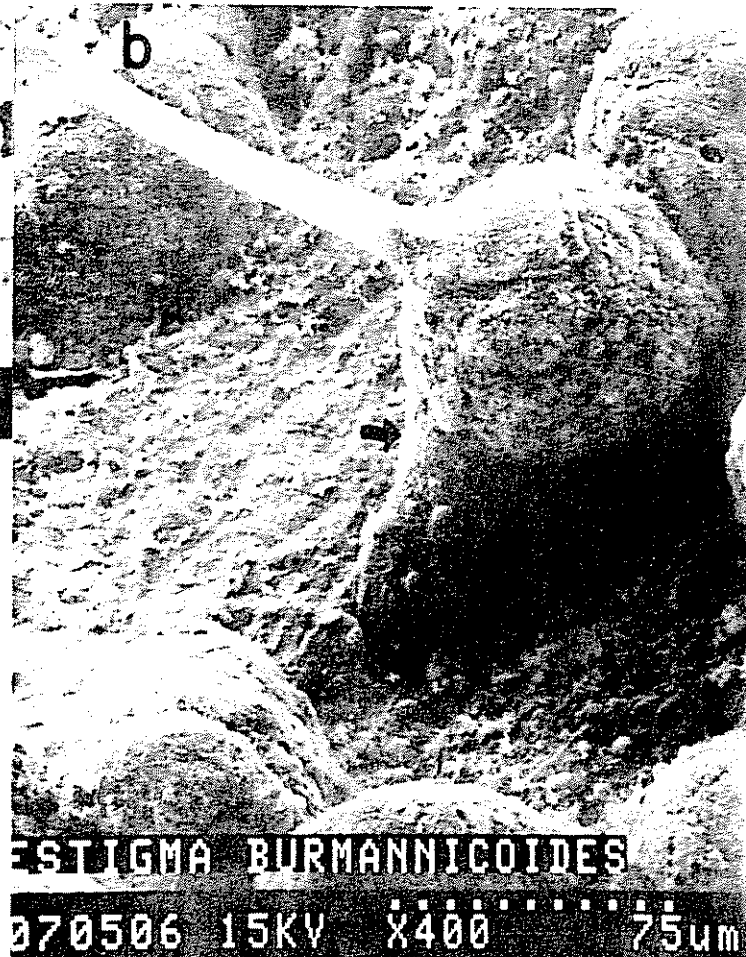
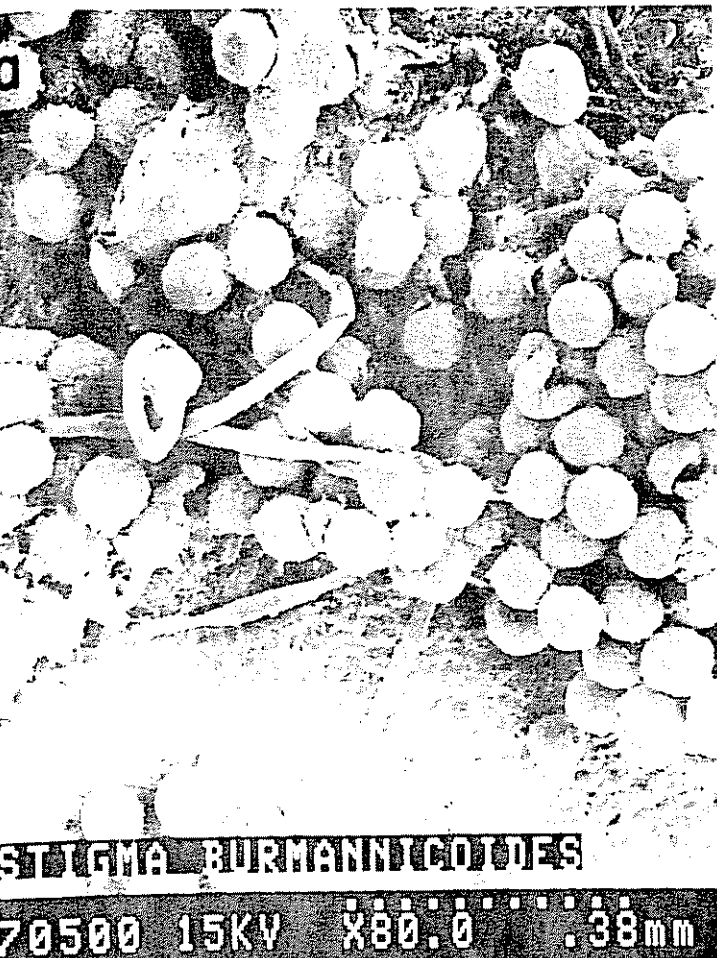


Figura 11. Polen de *M.acuminata* ssp *burmannicoides* germinando sobre los estigmas. a. Granos de polen mostrando sus tubos germinativos (80X); b. Germinación de un grano de polen (400 X).

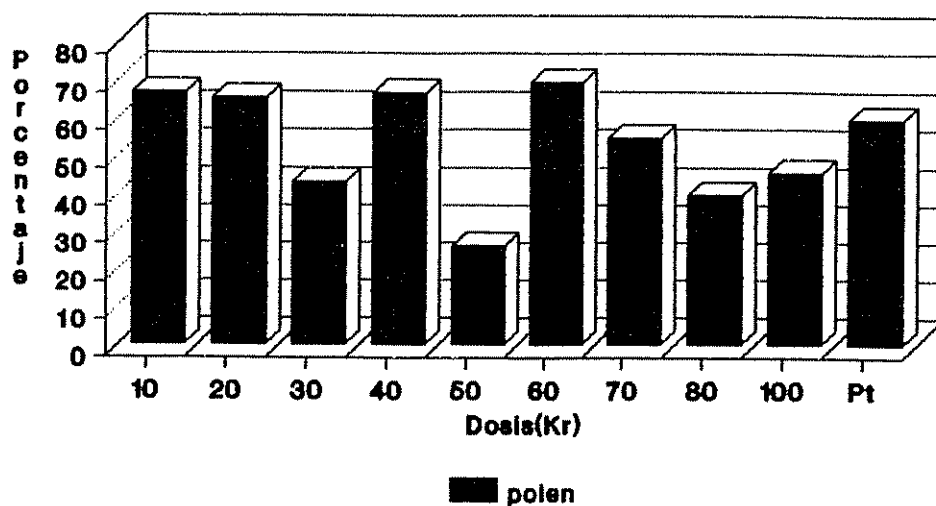


Figura 12. Porcentaje de germinación del polen de *M. acuminata ssp burmanni-coides*, a diferentes dosis de radiación.

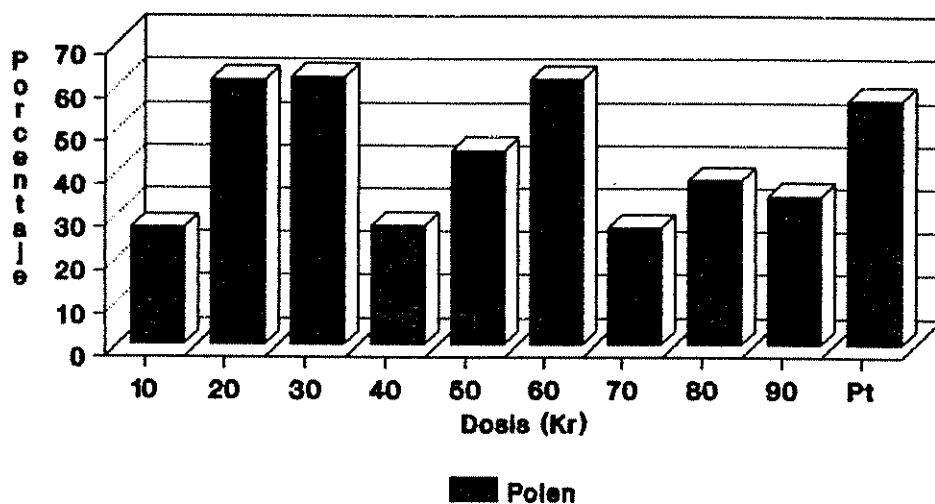


Figura 13. Porcentaje de germinación del polen de *M. balbisiana* tipo TANI, a diferentes dosis de radiación.

4. Polinización con polen irradiado.

La polinización de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* permitió la formación de frutos y semillas, para todas las dosis de radiación utilizadas (figura 14). Además no se observó diferencia apreciable de tamaño entre las semillas testigo y las semillas obtenidas con las diferentes dosis de irradiación aplicadas (cuadro 14). Se puede observar en la figura 15, que el crecimiento de las semillas es muy importante en los primeros 25 días después de la fecundación, para luego disminuir su incremento poco a poco hasta los 35 días, en donde su tamaño evoluciona muy poco.

Resultados similares se obtuvieron con las polinizaciones utilizando el polen de *Musa balbisiana* tipo TANI, en cruce con *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*. Los resultados se pueden observar en el cuadro 15 y la figura 16.

Además, utilizando el microscopio de fluorescencia, se observó que independientemente de la dosis de irradiación utilizada, los tubos polínicos entran en contacto con los óvulos (figura 17 y 18).

Cuadro 14. Tamaño en mm de las semillas obtenidas por polinizaciones con polen irradiado de *Musa acuminata ssp burmannicoides*.

Tratamiento	X15d	X25d	X35d	X45d	X55d
Pt	1,9	5,3	6,5	6,46	6,22
10 Kr	0,72	3,98	5,0	5,4	5,4
20 Kr	2,16	3,9	5,28	5,7	6,16
30 Kr	2,3	5,76	5,22	6,0	6,0
40 Kr	1,8	4,9	5,94	5,8	5,9
50 Kr	2,0	5,22	5,28	5,9	5,9
60 Kr	1,7	4,8	5,2	5,1	5,62
70 Kr	2,0	3,6	5,28	6,0	5,9
90 Kr	2,0	3,5	5,0	5,2	5,56

Cuadro 15. Tamaño en mm de las semillas obtenidas por polinizaciones interespecíficas con polen irradiado de *Musa balbisiana* tipo TANI.

Tratamiento	X15d	X25d	X35d	X45d	X55d
Pt	2,04	4,4	5,4	5,48	5,48
10 Kr	1,86	5,34	5,36	5,72	5,72
20 Kr	1,76	4,86	5,7	5,5	5,5
30 Kr	2,34	4,7	4,8	4,8	5,0
40 Kr	2,46	4,04	5,04	5,64	5,52
50 Kr	1,32	3,5	5,28	5,72	5,6
60 Kr	2,38	3,9	5,42	5,8	5,8
70 Kr	2,0	4,6	5,22	5,2	5,4
80 Kr	2,4	4,6	5,4	5,5	5,62
100 Kr	1,7	3,8	5,52	5,4	5,4

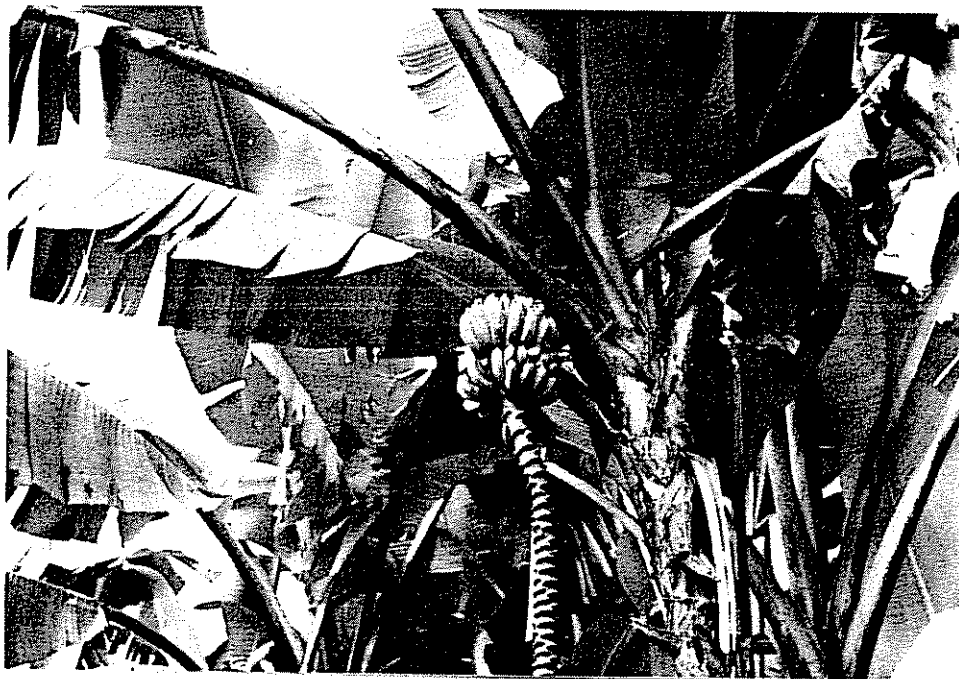


Figura 14. Racimo de *M.acuminata ssp burmannicoides* polinizado con polen irradiado.

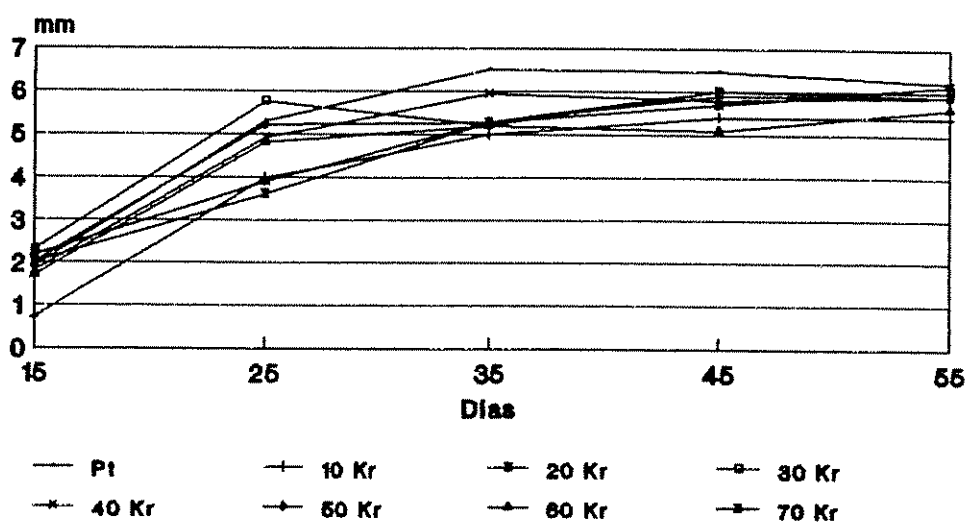


Figura 15. Tamaño de semilla obtenido por polinizaciones con polen irradiado de *M. acuminata* ssp *burmannicoides*.

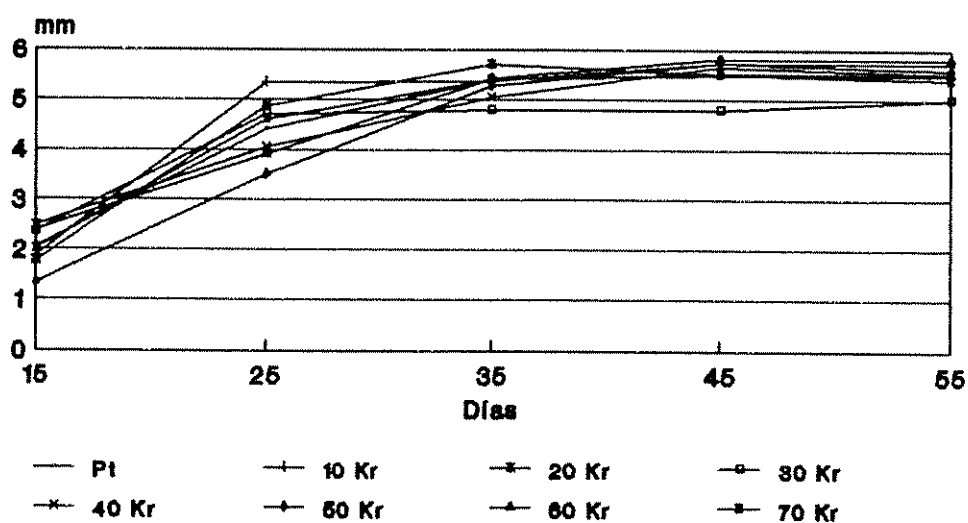


Figura 16. Tamaño de semilla obtenido por polinizaciones con polen irradiado de *M. balbisiana* tipo TANI.

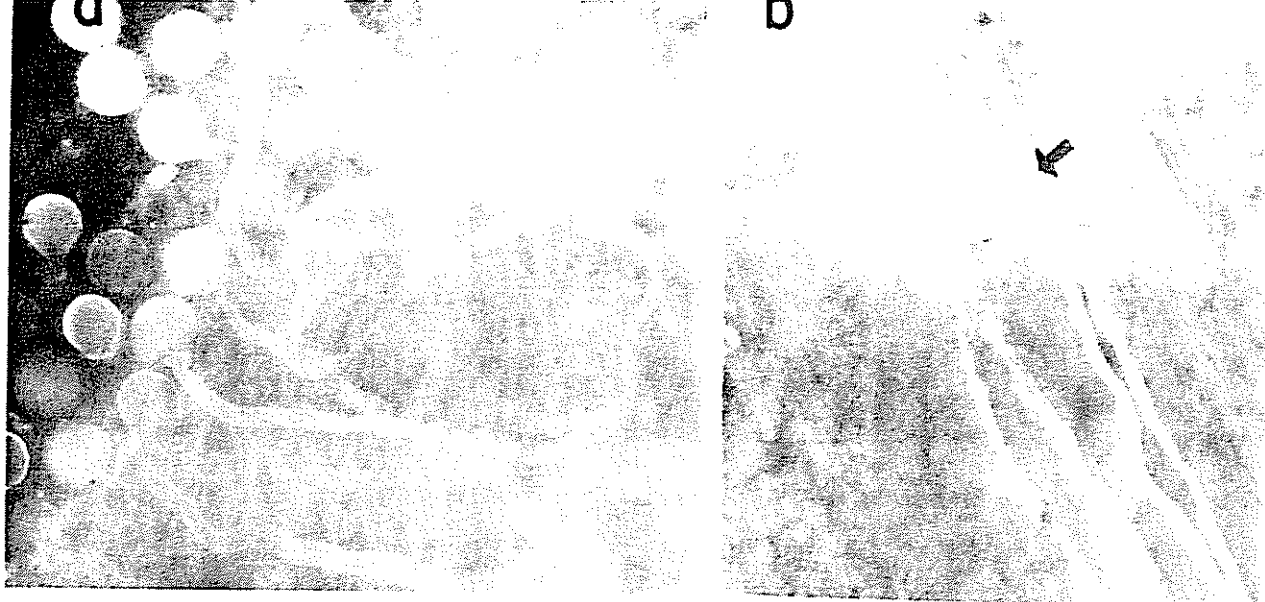


Figura 17. Recorrido de los tubos polinicos a cualquiera de las dosis utilizadas. a. Tubos germinativos en el estigma; b. Tubos bajando por el estilo.

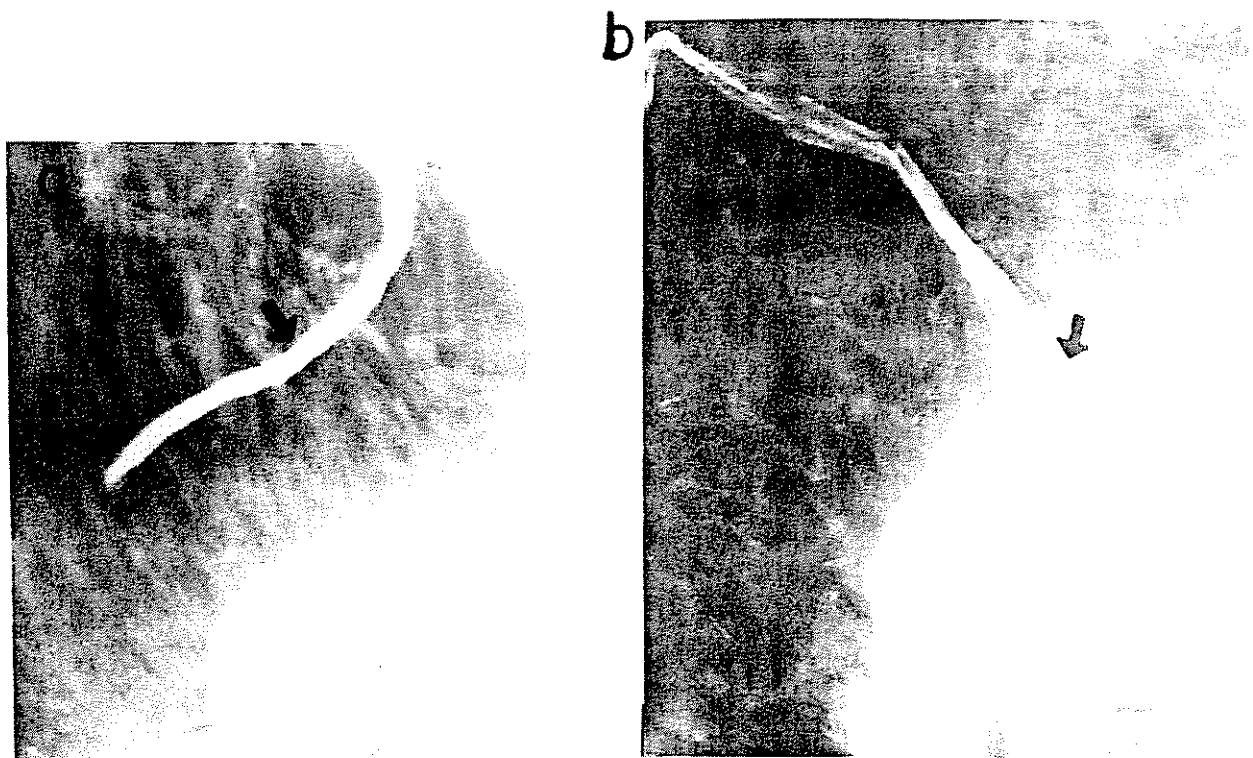


Figura 18. Recorrido de los tubos polinicos a cualquiera de las dosis utilizadas. a. Tubo pasando por los pelos pluricelulares con mucilago; b. Tubo haciendo contacto con un óvulo.

5. Estudio histológico.

Los resultados del estudio histológico demostraron que al polinizar con polen irradiado (20-100 Kr) de ambas subespecies, existe un desarrollo de los tejidos de la semilla, exceptuando el embrión (figura 19 y 20) y el endospermo (figura 21).

En la dosis de 10 Kr en autopolinizaciones de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* también existió un desarrollo de los tejidos, con la diferencia de que en este caso se observó el endosperma (figura 22 y 23), y no se pudo evidenciar la presencia del embrión.

En el testigo polinizado con polen sin irradiar, se observó el embrión (figura 24 y 25), y el endosperma (figura 26). Los frutos que no fueron polinizados, presentaron a los 15 días óvulos necrosados. Esto demuestra que el polen irradiado puede producir un estímulo para el desarrollo de la semilla, ya que al no recibir polen los óvulos no se desarrollan, pero cuando reciben polen irradiado a dosis muy altas (donde no se forma embrión, ni endosperma, debido a que no fueron fertilizadas), su tamaño y los otros tejidos son perfectamente normales (figura 27).

En las semillas resultantes de la polinización por el polen de *Musa balbisiana* tipo TANI, resultados similares se obtuvieron para las dosis superiores a 30 Kr. A 20 Kr se observó a los 45 días la presencia de un embrión degenerado (figura 28). Sin embargo, a 10 Kr se pudo constatar la formación del embrión completamente desarrollado (figura 29).

Con base en los resultados anteriores, el intervalo de la dosis de radiación fue acortado, utilizándose dosis de 3 Kr, 5 Kr, 7 Kr, 8 Kr. Como se muestra en las figuras 30 y 31, en las autopolinizaciones de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides*, para todas las dosis del intervalo acortado, a los 45 días se constató la presencia de un embrión bien desarrollado.

En los cruces interespecíficos con el polen de *Musa balbisiana* tipo TANI, irradiado con dosis del mismo intervalo (3, 5, 7, 8 Kr), también se evidenció a los 45 días la presencia de un embrión bien desarrollado (figura 32 y 33).

En los cortes histológicos de las semillas obtenidas con estas últimas dosis no se evidenció la presencia del endospermo, pero en cortes manuales de la semilla se pudo observar que esto solía ser variable. Por razones de tiempo

fué difícil observar todas las semillas para verificar la presencia del endosperma. Sin embargo en estudios futuros sería importante hacerlo, ya que los embriones haploides podrían encontrarse en las semillas sin endospermo.

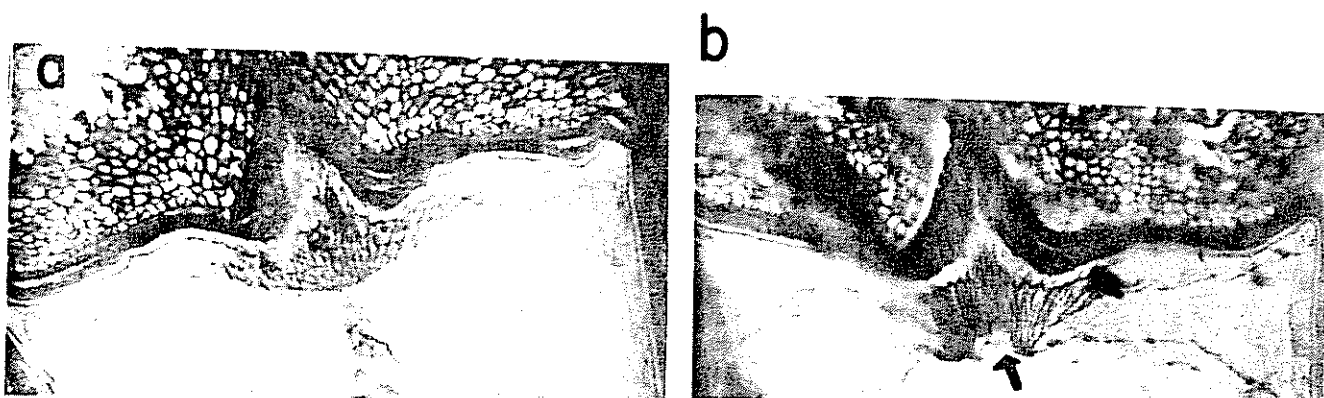


Figura 19. Corte histológico de una semilla de *M. acuminata* ssp *burmannicoides*, mostrando la ausencia del embrión, .Tratamiento 20 Kr. a. A los 45 días (10X); b. A los 55 días (10X).

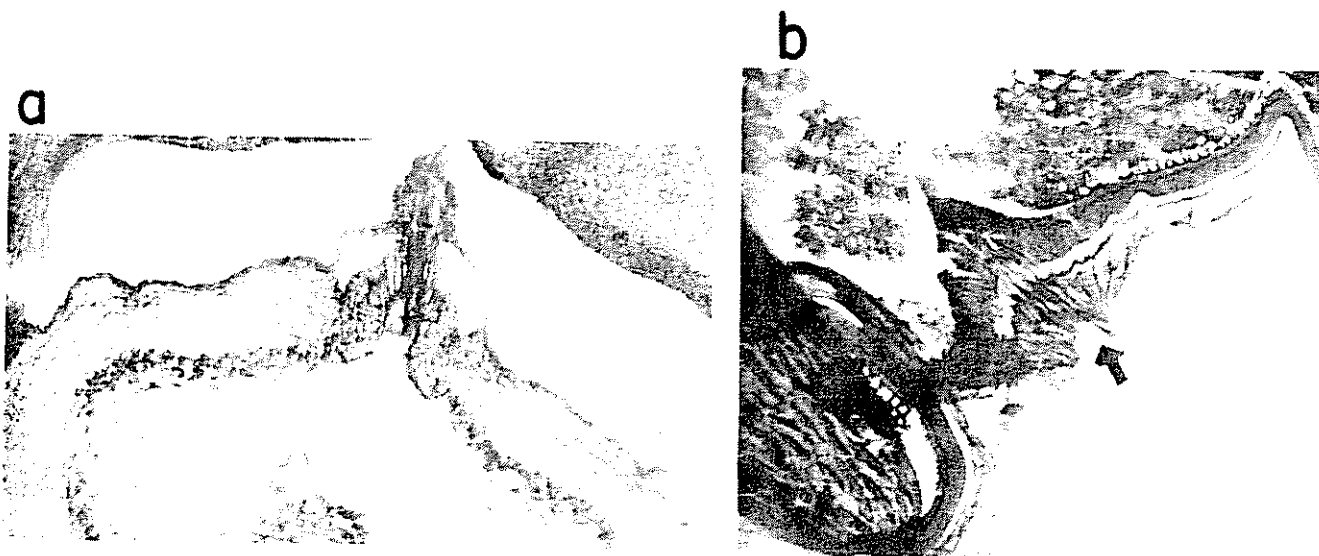


Figura 20. Corte histológico de una semilla de *M. acuminata* ssp *burmannicoides*, tratamiento 30 Kr. a. A los 15 días (10X); b. A los 55 días (10X).

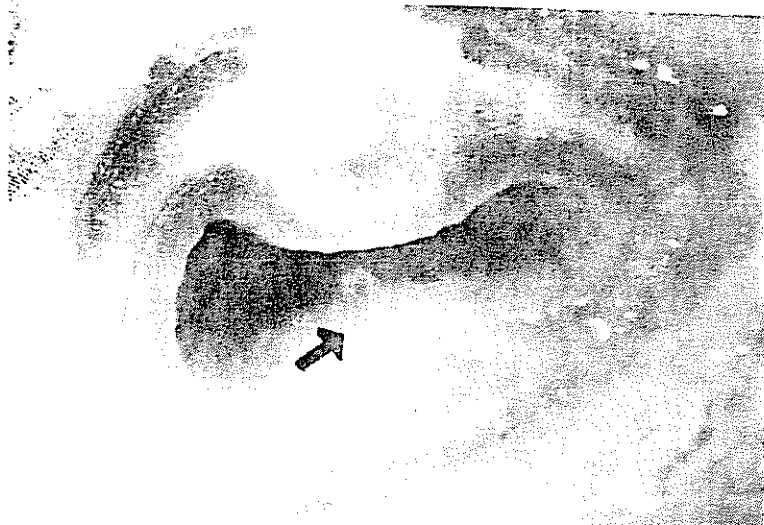


Figura 21. Corte longitudinal de una semilla de *M. acuminata* ssp. *burmannicoides* a los 45 días, mostrando la ausencia del endospermo; Tratamiento 20 Kr.

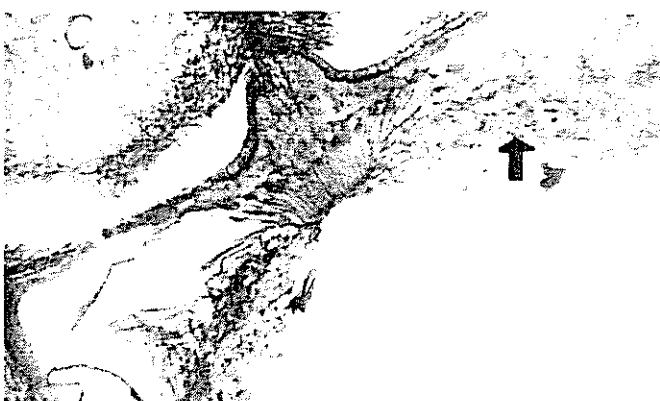


Figura 22. Corte histológico de una semilla de *M. acuminata* ssp. *burmannicoides*, mostrando la presencia del endospermo; tratamiento 10 Kr, a los 35 días (10 X).



Figura 23. Corte longitudinal de una semilla de *M. acuminata* ssp. *burmannicoides*, mostrando la presencia del endospermo; tratamiento 10 Kr.

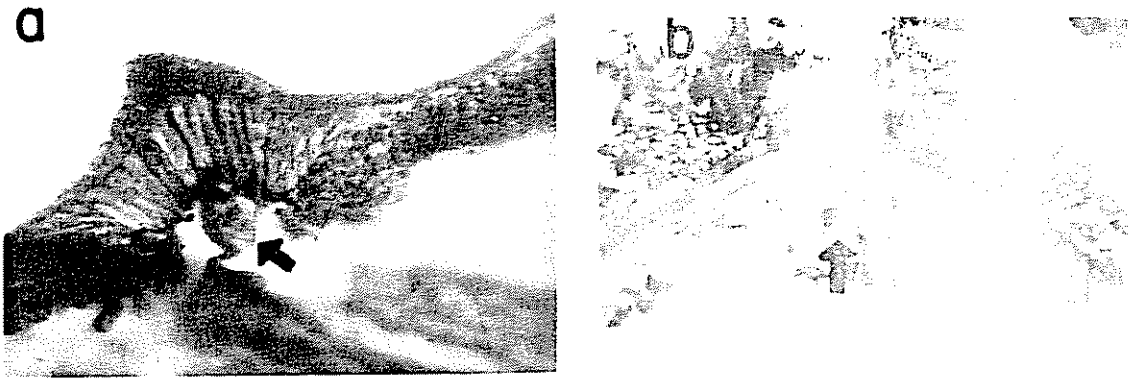


Figura 24. Corte histológico de una semilla testigo (polen sin irradiar). a. Proembrión unicelular a los 15 días (20X); b. Proembrión multicelular a los 25 días (10X).

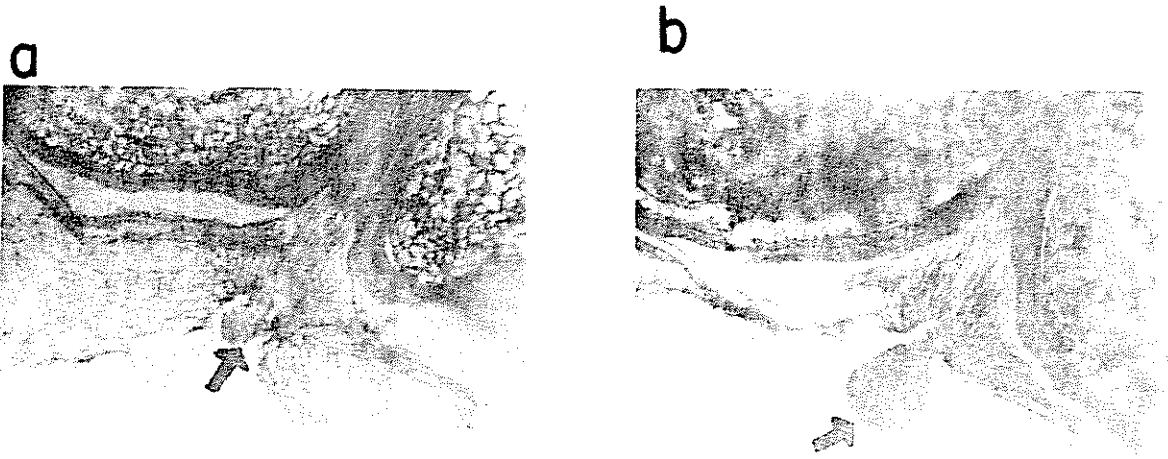


Figura 25. Corte histológico de una semilla testigo (polen sin irradiar). a. Embrión a los 45 días; b. Embrión a los 55 días.

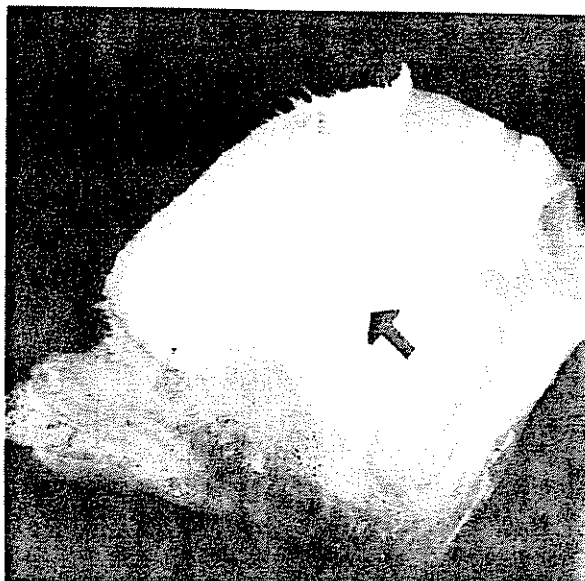


Figura 26. Corte longitudinal de una semilla de *M.acuminata* ssp *burmannicoides* a los 55 días, mostrando la presencia del endosperma en el tratamiento testigo.

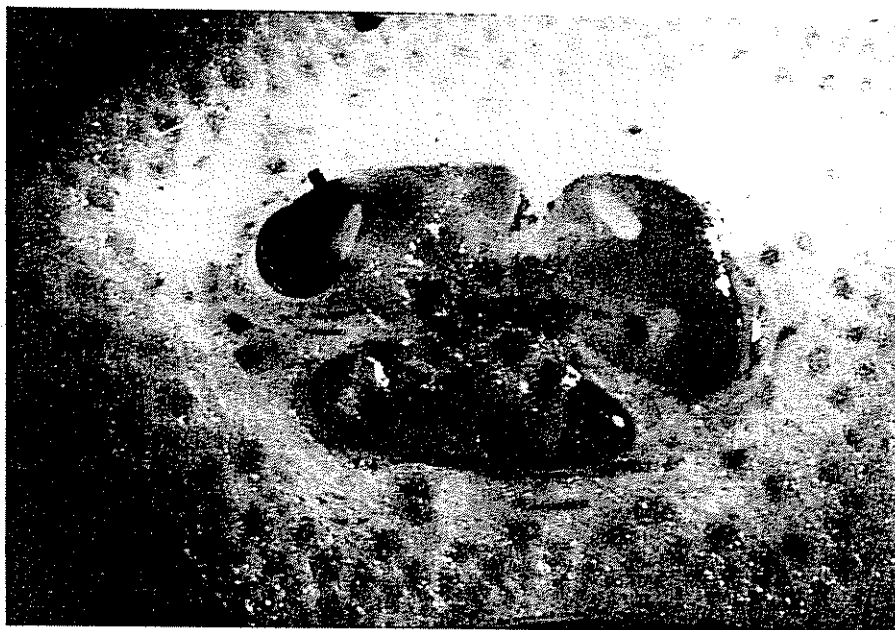


Figura 27. Corte radial de un banano sin polinizar. Mostrando óvulos necrosados a los 15 días.



Figura 28. Semilla formada por el polen de *M. balbisiana* tipo TANI sobre *M. acuminata* ssp *burmannicoides*. Mostrando un embrión degenerado a los 45 días. Tratamiento 20 Kr (20X).



Figura 29. Embrión formado a los 45 días utilizando polen de *M. balbisiana* tipo TANI, sobre *M. acuminata* ssp *burmannicoides*. Tratamiento 10 Kr (20X).

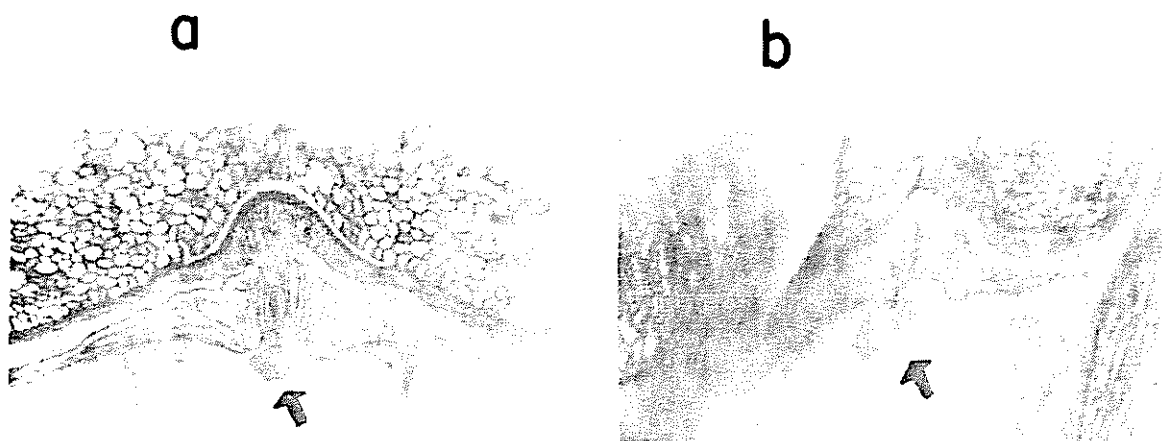


Figura 30. Embriones formados a los 55 días en autopolinizaciones con polen irradiado *M.acuminata* ssp *burmannicoides*. a. Tratamiento 3 Kr (20X); b. Tratamiento 5 Kr (10X).

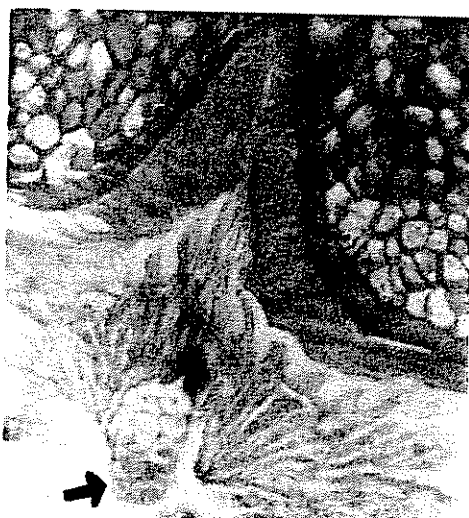


Figura 31. Embrión formado a los 45 días en autopolinizaciones de *M.acuminata* ssp *burmannicoides*. Tratamiento 7 Kr (20X).

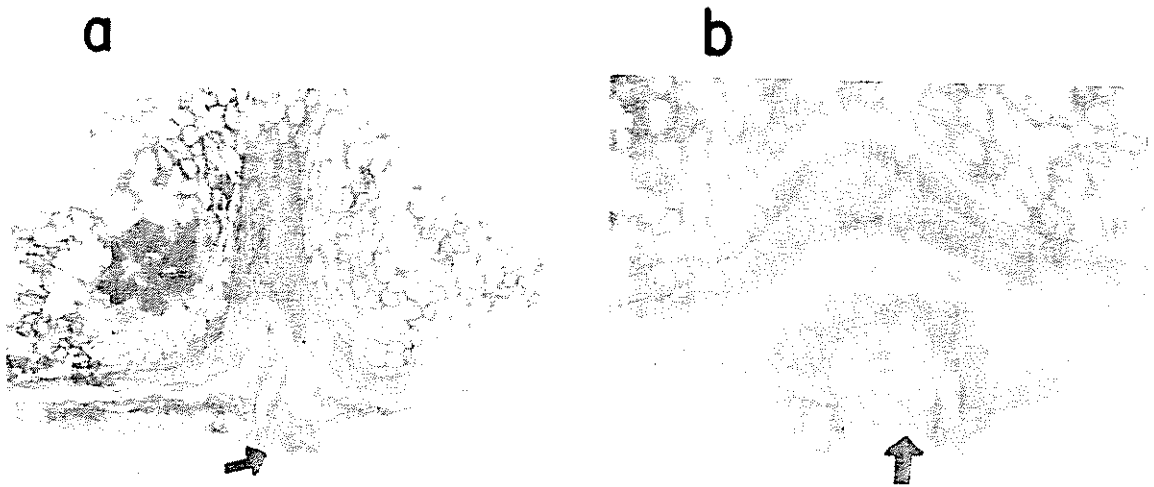


Figura 32. Embriones formados a los 45 días por polinizaciones con polen irradiado de *M. balbisiana* tipo TANI sobre *M. acuminata* ssp *burmannicoides*. a. Tratamiento 3 Kr (10X); b. Tratamiento 5 Kr (10X).

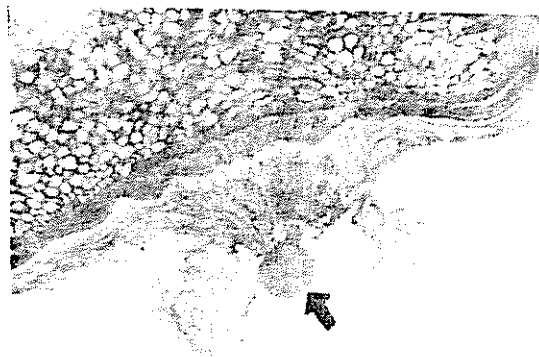


Figura 33. Embrión formado a los 45 días por polinización con polen irradiado de *M. balbisiana* tipo TANI sobre *M. acuminata* ssp *burmannicoides*. Tratamiento 7 Kr (10X).

6. Rescate de embrión.

En esta etapa, tomando como base los resultados del estudio histológico, el cual nos permitió conocer en cuales tratamientos y a que edad se formaban los embriones, se procedió a realizar el rescate de embriones inmaduros, puesto que no se conocía si estos llegarían a madurar completamente.

En el rescate de los embriones inmaduros realizado a los 45 días de edad, ninguno de los tratamientos permitió la formación de callos.

Con los embriones inmaduros rescatados a los 55 días después de la polinización, la mayor formación de callos (figura 34) se obtuvo en los tratamientos de 3Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.acuminata* ssp *burmannicoides*) y 5Kr (*M. acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI) con un 14% (cuadro 16).

Posteriormente se procedió a realizar el rescate de embriones maduros a los 80 días, para aquellos tratamientos en los cuales los embriones lograron madurar. En este punto, el mayor porcentaje de germinación de los embriones (figura 35), se obtuvo en el tratamiento testigo con un 82 %, seguido por el tratamiento de 3Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X

M.acuminata ssp *burmannicoides*) con un 78%, luego 5Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI) con 58% y 8Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI) con 30%.

No se formaron embriones maduros en los tratamientos 5Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.acuminata* ssp *burmannicoides*), 8Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.acuminata* ssp *burmannicoides*), 10Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* x *M.acuminata* ssp *burmannicoides*). Sin embargo en los cruces *M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI, se formaron embriones maduros en todos los tratamientos. Estos resultados se muestran en el cuadro 17.

Cabe señalar que en las dosis en donde los embriones maduraron, se pudo observar semillas que no poseían endosperma, pero que sí poseían un embrión bien desarrollado. El tratamiento donde más se observó este fenómeno fue en el tratamiento 5Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI), como se puede observar en la figura 36.

Cuadro 16. Formación de callos a partir de embriones de 55 días.

Tratamiento	Porcentaje
3 Kr (B)	14
3 Kr (T)	0
5 Kr (B)	0
5 Kr (T)	14
7 Kr (B)	4
7 Kr (T)	2
8 Kr (B)	0
8 Kr (T)	8
10 Kr (T)	6

(B) cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.acuminata* ssp *burmannicoides*.

(T) cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI.

Cuadro 17. Porcentaje de germinación de embriones maduros (80 días).

Tratamiento	Porcentaje
Testigo (T)	82
3 Kr (B)	78
3 Kr (T)	5
5 Kr (B)	*
5 Kr (T)	58
7 Kr (B)	10
7 Kr (T)	7
8 Kr (B)	*
8 Kr (T)	30
10 Kr (T)	

(B) cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.acuminata* ssp *burmannicoides*.

(T) cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* X *M.balbisiana* tipo TANI.

* No formó embriones maduros.

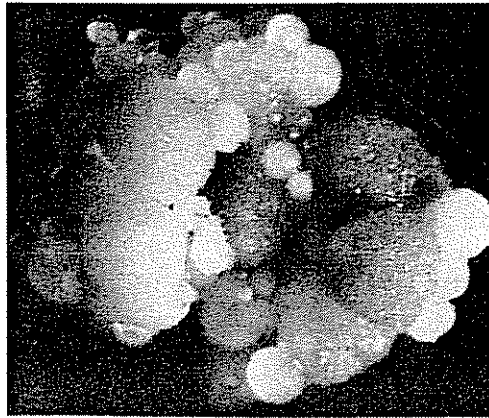


Figura 34. Callo formado de un embrión de 55 días. Tratamiento 7 Kr. Cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* por *M.balbisiana* tipo TANI.



Figura 35. Embrión de 80 días, germinando *in vitro*. Tratamiento 7 Kr. Cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* por *M.balbisiana* tipo TANI.



Figura 36. Embrión maduro a los 80 días, mostrando ausencia de endosperma. Tratamiento 5 Kr. Cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* por *M. balbisiana* tipo TANI.

7. Coloración de ADN.

En las tinciones realizadas con el colorante DAPI, los granos de polen mostraron en el testigo dos núcleos normales (núcleo vegetativo y núcleo generativo), uno con forma ovalada y el otro con forma redondeada (figura 37). Esta forma característica no se encontró en ninguno de los granos de polen que fueron sometidos a radiación, ya que aun en la dosis más baja (3Kr), se notó una desorganización del material nuclear, la cual se incrementó en las dosis más altas (figura 38).

Con las observaciones de los núcleos en los tubos polínicos, se pudo constatar en el testigo la presencia de los dos gametos masculinos descendiendo por el tubo polínico (figura 39). Al contrario, en los tubos polínicos del polen irradiado, se observó la cromatina en forma desorganizada, sobre todo en las dosis de 8 Kr en adelante (figura 40).

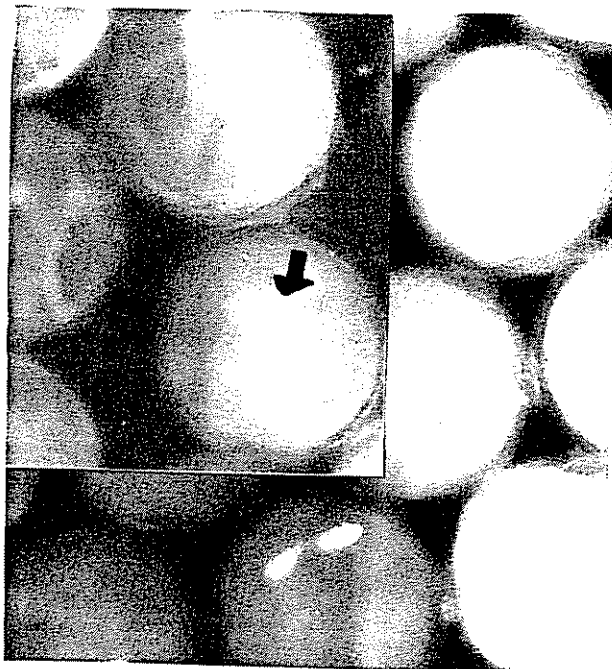


Figura 37. Polen testigo de *M. acuminata* ssp *burmannicoides*, mostrando el núcleo generativo y el núcleo vegetativo.

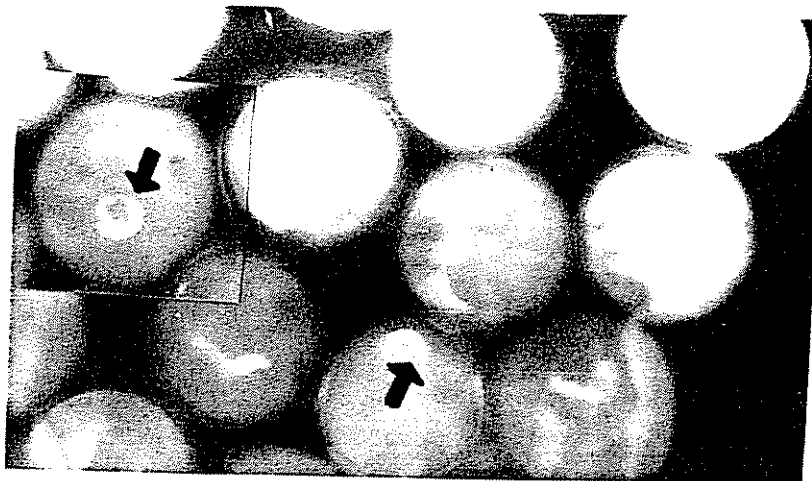


Figura 38. Polen de *M. acuminata* ssp *burmannicoides* mostrando su material nuclear completamente desorganizado. Tratamiento 50 Kr.



Figura 39. Tubo polínico de *M.acuminata* spp *burmannicoides*, mostrando los dos gametos descendiendo.



Figura 40. Tubo polínico de *M.acuminata* spp *burmannicoides* mostrando el descenso de una cromatina desorganizada. Tratamiento 8 Kr.

8. Cariotipo.

La prueba del cariotipo fué aplicada a las plantas que hasta este momento habían emitido raíces. En el caso del testigo se pudo confirmar la presencia de un total de 22 cromosomas ($2n=22$). De las plantas obtenidas a partir del cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* por *M.balbisiana* tipo TANI (polen irradiado 5 Kr), una se encontró haploide con un número de cromosomas $n=11$, y en el cruce *M.acuminata* ssp *burmannicoides* por *M.acuminata* ssp *burmannicoides* (polen irradiado 7 Kr), otra resultó ser haploide con un número de cromosomas $n=11$.

Se enviaron algunas plantas o embriones al CIRAD en Francia, para la prueba de citometría en flujo (Anexo 7), ninguna era haploide.

Para resumir, de todas las plantas que emitieron raíces, por el momento solamente dos individuos revelaron ser haploide. Sin embargo todavía muchas plantas faltan por emitir raíces, lo que nos permite predecir que quizás se puedan obtener otras plantas haploides.

V. DISCUSION

1. Pruebas preliminares.

1.1. Microesporogénesis y forma de la tétrade.

Se demostró que para las condiciones encontradas en el CATIE, el polen de la subespecie *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* pasa por un proceso normal de meiosis. También a través del conteo de las tétrades, se reveló que existía un 76,1% de tétrades esféricas, lo que indica una buena fertilidad del polen (Dessauw,1987).

1.2. Viabilidad y germinación del polen.

De los tres colorantes utilizados en las pruebas de viabilidad del polen, si planteamos que los resultados obtenidos con la germinación sobre los estigmas, son los que más se acercaron a la realidad, las cifras que se encontraron en el caso de la fluoresceína estan sobrestimadas. Lo anterior puede explicarse debido a que , la fluoresceína estima la viabilidad celular basada en la función enzimática de la permeabilidad celular, puesto que se libera una esterasa al entrar en contacto con ésta (CIRAD,1989). En otras palabras, la fluoresceína determina si el polen está o

no vivo, pero no si está en buen estado de madurez, y por consiguiente capaz de germinar.

Para el polen de *M.acuminata* ssp *burmannicoides*, tanto el colorante de Alexander como el Azul de Algodón, permitieron una aproximación excelente a la media real de germinación. Sin embargo Roman *et al* (1988), en un estudio realizado sobre la fertilidad de 20 diploides de banano concluyeron que se debe utilizar la técnica de coloración diferencial de polen abortado y polen no abortado del colorante de Alexander, debido a que el Azul de Algodón enmascara los resultados, por la razón de que muestra un intermedio parcialmente fértil. Además de acuerdo con el manual de histología del CIRAD (1989), el colorante de Alexander también estima si se completó la gametogénesis, lo que podría ser útil en este tipo de trabajos.

Para el polen de *Musa balbisiana* tipo TANI, aunque no se obtuvo diferencia significativa entre el colorante de Alexander y el Azul de Algodón, en la estimación de los porcentajes de germinación, los resultados no coinciden exactamente con los que se obtuvieron con la germinación sobre los estigmas de *M.acuminata* ssp *burmannicoides*. Lo cual tiene cierta influencia puesto que existe en el género *Musa* ciertos grados de incompatibilidad entre las especies

(Simmonds, 1987). No obstante, el porcentaje así estimado es el que nos interesa con fines prácticos, puesto que es sobre *M.acuminata* ssp *burmannicoides* donde se realizan las polinizaciones.

Debido a estos datos, podemos decir que la mejor evaluación para determinar la capacidad de germinación del polen de estas dos subespecies, se obtiene a través de la prueba directa sobre los estigmas. Sin embargo la prueba utilizando el colorante de Alexander puede ser complementaria.

2. Conservación de polen.

Se pudo evidenciar que no hubo diferencia en la capacidad de germinar entre el polen conservado 48 horas a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), o bajo $9^{\circ}\text{C} \pm 1$. No obstante, se optó por conservar el polen a 9°C puesto que la temperatura en el refrigerador es más estable que la temperatura ambiente, además de dar más flexibilidad en la planificación de las polinizaciones en el campo.

3. Irradiación de polen.

El porcentaje de germinación del polen al ser tratado con una radiación cada vez más alta no se afectó tanto, excepto en las dosis máximas donde este disminuyó notablemente. Lo anterior demuestra que como en otras especies, por ejemplo en tabaco (Grant *et al*, 1980), el polen de las musaceas es capaz de soportar una radiación muy alta como 100Kr.

Además, no existe una disminución constante del porcentaje de germinación, lo cual podría explicarse tomando en cuenta la botánica estructural de estos diploides. Las manos de flores masculinas salen con un ritmo promedio de una por día, así que las que se irradian hoy no son las mismas que se irradian en los días siguientes, aunque son de la misma planta. De igual manera las flores femeninas también tienen un ritmo de emisión de una mano por día, lo que implica el uso de flores diferentes cada vez en la determinación del porcentaje de germinación. El estado fisiológico y la capacidad de receptividad podría ser diferente entre cada una debido a condiciones climáticas.

Ahora bien, estas diferencias en los porcentajes de germinación, no fueron tan grandes como para tener influencia

en el método y lo importante fue determinar que el polen es capaz de germinar después de haber recibido cualquiera de las dosis utilizadas, además de poder hacer contacto con los óvulos.

4. Polinización con polen irradiado.

Los resultados de esta etapa comprueban que existe un estímulo al desarrollo de la semilla por parte del polen irradiado a cualquiera de las dosis utilizadas en este experimento, ya que cuando no se utiliza ningún tipo de polen los óvulos no crecen y se necrosan a los 15 días. Además las semillas formadas con polen irradiado a cualquiera de las dosis crecen igual que el testigo polinizado con polen normal.

También se conoce que el estímulo que reciben no resulta siempre de la fertilización doble, puesto que en el intervalo de dosis de 10 Kr a 100 Kr utilizando el polen de *M.acuminata* ssp *burmannicoides*, no se forma el embrión, y que en dosis de 10 Kr a 3 Kr la formación del endosperma es muy variable. Los resultados varían un poco cuando se utiliza polen de *M.balbisiana* tipo TANI, ya que no se forma embrión en el intervalo de 20 Kr a 100 Kr. No obstante, el proceso de formación del endosperma es igual que en el caso anterior.

La no formación del endosperma con algunas de las dosis de irradiación, nos da un indicio de que no se realizó la fertilización doble y por lo tanto, el desarrollo del embrión pudo realizarse por la vía partenogenética y por consiguiente, algunas de las plantas que se formaron podrían ser haploides.

Estas observaciones se confirman con los cortes histológicos, en donde se comprobó plenamente que aunque el desarrollo de la semilla sea estimulado por el polen irradiado, no en todas las dosis se da la formación del embrión. Cuando se utilizó el polen de *M.acuminata* ssp *burmannicoides* en las dosis de 10 Kr en adelante, se observó la formación de todos los tejidos internos de la semilla, y la coronilla nucelar con una abertura donde debería insertarse el embrión. Lo mismo fue encontrado cuando se utilizó polen de *M.balbisiana* tipo TANI, en las dosis de 30 Kr en adelante ya que a 20 Kr se observó un embrión degenerado y a 10 Kr se observó la presencia del embrión.

En las dosis de 8 Kr, 7 Kr, 5 Kr y 3 Kr, utilizando el polen de ambas subespecies, se pudo observar en cortes histológicos, la presencia del embrión y no se observó el endosperma, salvo en la dosis de 10 Kr (*M.acuminata* ssp *burmannicoides*). Pero como se acotó anteriormente en

observaciones al esteroscopio de semillas enteras que luego se partieron, se observó en estas dosis que algunas tenían endosperma y otras no. Lo cual nos hace pensar que algunas podrían ser fertilizadas y otras solamente estimuladas.

Los resultados obtenidos en la etapa de rescate de embrión, hacen constatar que el rescate de embriones inmaduros (en las dosis donde se sabe que hay embriones) a los 45 días es muy temprano para lograr que se desarrollen ya que no se obtuvo ningún callo a partir de embriones de esta edad. Al contrario en el rescate a los 55 días existió formación de callos, los cuales mostraron una tendencia no del todo marcada a disminuir con el aumento de la dosis.

En el rescate de embriones maduros de 80 días, en las dosis de 3 Kr, 5 Kr, 7 Kr, 8 Kr, 10 Kr, utilizando polen de *M. balbisiana* tipo TANI, los embriones pudieron lograr la madurez. Pero al utilizar el polen de *M. acuminata* ssp *burmannicoides* en este mismo intervalo de dosis, sólo lograron madurar en las dosis de 3 Kr y 7 Kr. Esto ha sido demostrado en otros cultivos. Así Grant *et al* (1980), reportaron que al utilizar diferentes especies de tabaco, demostraron que el estímulo y los posteriores resultados varían al utilizar polen de diferentes especies. Estos resultados también mostraron una tendencia no del todo

marcada, a disminuir el porcentaje de germinación de los embriones a medida que aumentaba la dosis de irradiación.

Los resultados obtenidos en las tinciones con el colorante DAPI, revelaron que existe una desorganización de la cromatina nuclear a medida que se aumenta la dosis de irradiación. También esta técnica nos permitió evidenciar que al momento de la germinación del polen irradiado, el material que desciende por el tubo polínico no se organiza en forma de núcleos, como se observó en el polen testigo, si no que se presenta como cromatina suelta. Lo anterior permite pensar que en este estado el polen no puede fertilizar los sacos embrionarios, pero si estimular el desarrollo de la oosfera como ha sido demostrado por otros autores, en Tabaco (Pandey, 1980).

Los resultados del cariotipo confirman que con esta técnica se pueden obtener plantas haploides. Sin embargo el porcentaje de formación de éstas tiene que ser muy bajo y por lo tanto se necesitaría tener muchas más plantas regeneradas para lograr incrementar el número de haploides obtenidos. Como se explicó anteriormente, es difícil aún tener un porcentaje de plantas haploides debido a que todas no han enraizado. Sin embargo como se redujo el intervalo de dosis donde se pueden formar embriones, que es el paso más

importante en estos trabajos, donde no se tenía ninguna información al respecto. El paso a seguir en el futuro es realizar muchas polinizaciones con polen irradiado en el intervalo antes mencionado, para poder rescatar la mayor cantidad de embriones posibles y así obtener una mayor cantidad de plantas, lo que daría una mayor probabilidad de obtener más cantidad de plantas haploides. Esta observación ha sido comprobada por otros autores, en otros cultivos como por ejemplo Pandey *et al* (1990), en *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit), demostraron que solo un 20% de las plantas obtenidas resultaron ser haploides.

Es importante señalar la posibilidad de que algunas de las plantas que se mandaron al CIRAD para la prueba de citometría en flujo, pudieran haber tenido una duplicación espontánea de sus cromosomas, lo cual es muy común en *Musa* y por esto aparecen como diploides.

La formación de embrión en semillas obtenidas por polinización con polen irradiado a diferentes dosis, la ausencia del endosperma en muchas de las semillas y la presencia de cromatina suelta en el polen sometido a radiación, así como la obtención de una planta haploide nos permite decir que este método puede ser muy útil en la búsqueda de plantas homocigotas. Los estudios ~~futuros~~

tendrán que realizarse dentro del intervalo estrecho de de las dosis de radiación definidas en el estudio. Además se debe aumentar el número de polinizaciones y el número de embriones rescatados. En fin, se debe seguir utilizando el polen de *M.balbisiana* tipo TANI, lo que permitiría, en caso de doblamiento espontáneo del lote cromosómico, detectar las plantas homocigotas utilizando la técnica de electroforesis, desarrollada por Horry, (1990).

VI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados, se formularon las siguientes conclusiones:

1. Los colorantes que permiten evaluar mejor la viabilidad del polen de estos diploides son el colorante de Alexander y el Azul de Algodón.

2. El método que permite evaluar mejor el porcentaje de germinación, es el de germinación sobre los estigmas.

3. El polen de las dos subespecies estudiadas puede conservarse a 9°C por 48 horas y es perfectamente capaz de fertilizar .

4. El polen de ambas especies es capaz de germinar en cualquiera de las dosis utilizadas en este estudio.

5. En el intervalo de radiación gamma utilizado, los tubos polínicos son capaces de alcanzar los óvulos.

6. El polen irradiado de *Musa acuminata* ssp *burmannicoides* así como el de *Musa balbisiana* tipo TANI, estimula el desarrollo de las semillas de *Musa acuminata* ssp

burmannicoides, a cualquiera de las dosis de irradiación utilizadas entre 3 Kr y 100 Kr.

7. Existe un desarrollo del embrión al polinizar con polen de *M.acuminata ssp burmannicoides* en las dosis de 3 Kr, 5 Kr, 7 Kr y 8 Kr. Cuando utilizamos polen de *M.balbisiana* tipo TANI, se forman embriones en las dosis anteriores pero el intervalo se amplía hasta 10 Kr.

8. El desarrollo del endosperma es muy variable, aunque se pudo evidenciar en las semillas resultantes de la polinización con polen irradiado con dosis de 10 Kr y menos.

9. La mejor edad para el rescate de embriones inmaduros producto de la polinización con polen irradiado es a los 55 días, y para los embriones maduros a los 80 días.

10. Al someter el polen a una dosis de radiación cada vez más alta, existe una desorganización de la cromatina, lo cual explica que en ciertos casos el desarrollo de la semilla y del embrión pueda ser partenogenético y no resultado de la fertilización.

11. Se lograron obtener dos plantas haploides, una en la dosis de 5 Kr del cruce *M.acuminata ssp burmannicoides* por

M. balbisiana tipo TANI y la otra en la dosis 7 Kr del cruce *M. acuminata* ssp *burmannicoides* por *M. acuminata* ssp *burmannicoides*, lo que demostró que en este caso existió un desarrollo partenogenético de la oosfera.

VII. RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda:

1. Retomar este estudio y realizar muchas polinizaciones utilizando el polen de *M. balbisiana* tipo TANI, después de ser sometido a una dosis de radiación comprendida en el intervalo de 5 a 10 Kr, el cual es el más alto que permitió obtener embriones viables.

2. Realizar el rescate de embriones en grandes cantidades, pero utilizando preferiblemente las semillas sin endosperma, con la finalidad de poder obtener un mayor número de plantas haploides.

VIII. LITERATURA CITADA

- BAKRY, F.; HORRY, J.P.; TEISSON, C; TEZENAS DU MONTCEL, H;
GANRY, J. 1990. L'amélioration génétique des bananiers à
l'IRFA/CIRAD. Francia. Fruits (Special bananes):25-40.
- BOUHARMONT, J. 1963. évolution de l'ovule fécondé chez *Musa
acuminata* Colla. subsp. *burmannica* Simmonds. Louvain,
Belgique, Institut Carnoy. 21 p.
- CHAMPION, J. 1967. Les bananiers et leur culture. Botanique
et génétique des bananiers. Paris, IFAC. v.1, 214 p.
- . 1968. El plátano. Trad. Fermin Palenque. Barcelona,
Editorial Blume. 247 p.
- CHARPENTIER, J. M. 1970. La position des feuilles du bananier
"Poyo". Fruits (Francia) 25(7-8): 508-510.
- CIRAD. LABORATOIRE DE CYTOGÉNÉTIQUE ET D'HISTOLOGIE
VÉGÉTALE. 1989. Manuel pratique d'histologie végétale.
Montpellier, Francia. 61 p.
- DESSAUW, D. 1987. Etude des facteurs de la stérilité du
bananier (*Musa spp*) et des relations cytotaxonomiques
entre *M. acuminata* colla et *M. balbisiana* colla.
Tesis Ph D. Orsay, Francia, Université de Paris. 154 p.
- DODDS, K. S. 1943. Genetical and cytological studies of *Musa*.
Certain edible diploids. Journal of genetic (India)
45(2):113-138.
- . 1945. Genetical and cytological studies of *Musa*.6.
The development of the female cells of certain edible
diploids. Journal of genetic (India) 46: 161-169.

- DODDS, K. S.; SIMMONDS, N.W. 1946. Genetical and cytological studies of *Musa*. B. The formation of polyploid spores. *Journal of genetic (India)* 47:223-241.
- ESCALANT, J.V. 1987. Les bananiers. Diploïdes en culture *in vitro* (*M. acuminata* et *M. balbisiana*). Etude du comportement et recherche de variabilité. Tesis Ph D. Montpellier, Francia, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. 174 p.
- ; TEISSON, C. 1987. Comportements *in vitro* de l'embryon isolé du bananier (*Musa* species). *Fruits (Francia)* 42(6):333-342.
- ; TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryo of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant cell Reports (EE.UU)* 7: 665-668.
- FAHN, A. 1978. Anatomía vegetal. Trad. F García. Madrid, Selecciones Gráficas. 643 p.
- GAUCH, H. G.; DUGGAR, W. M. 1954. Maryland agricultural experiment station. Bulletin A-80. p 1-43.
Citado por: Vasil, I. K. 1987. Physiology and culture of pollen. *International review of cytology (EE.UU.)* 107:137.
- GRANT, J.E.; PANDEY, K.K.; WILLIAMS, E.G. 1980. Pollen nuclei after ionising irradiation for egg transformation in *Nicotiana*. *New Zealand Journal of Botany (New Zealand)*. 18(3): 339-341.
- HOFFMANN, F.; SIBLEG, R.B; TSAY SHYUN-SHYUN. 1988. Transgenic antibiotic resistance may be differentially silenced in germinating pollen grains. *Plant Cell Reports (EE.UU.)* 7(7):542-545.
- HORRY, J.P. 1989. Chimiotaxonomie et organisation génétique dans le genre *Musa*. *Fruits (Francia)* 10 (44):509 - 520.

- HRABETOVA, E.; TUPY, J. 1964. The Growth effect of Some Sugar and Their Metabolism in pollen Tubes. *In* Pollen Physiology and Fertilization. Ed. H. F. Linskens. Amsterdam, North-Holland Publishing. p 95-102.
- KATAYAMA, Y. 1933. Haploid formation by X-rays in *Triticum monococcum*. *Cytologia (Japón)* 5:235-237.
- LACADENA, J. R. 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis. *In* Haploids in Higher Plants. proceedings of a international symposium, guelph, Ontario, Canadá, 1974. Edited by K. J. Kasha. guelph, Ontario, University of Guelph. p 13-32.
- LARTER, L.N. 1934. Sports of the Gros Michel. *Journal of the Jamaica Agricultural Society (Jamaica)*. 38:461-465.
- LEON, J. 1987. Escitamineas: Musáceas, Zingiberaceas, Cannáceas, Maratáceas. *In* Botánica de los cultivos tropicales. 2 ed. San José, Costa Rica, IICA p 88-106.
- MAHESWARI, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. Nueva York, Mc Graw Hill.
- McGRAHAN; MERRITT, 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.
- MEPHAN, R. H.; LONE, H.R. 1970. Observations on the fine structure of developing microspore of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma (EE.UU.)* 70:1-20.
- MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J. 1967. The effect of N₂O on pollen tube mitosis in styles and its potential significance for inducing haploidy in potato. *Euphytica (Holanda)* 16:190-198.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum* (Dinamarca) 15:473-479.
- PANDEY, K.K.; PHUNG, M. 1982. "Hertwig effect" in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics* (EE.UU.) 62(4):295-300.
- ; PRZYWARA, L.; SANDERS, P.M. 1990. Induced parthenogenesis in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. *Euphytica*(Holanda) 51:1-9.
- POEHLMAN, J.M. 1983. Mejoramiento genético de las cosechas. Trad. N. Sánchez. México, Editorial Limusa. 453 p.
- POWELL, W.; CALIGARI, P.D.S.; HAYTER A.M. 1983. The use of pollen irradiation in barley breeding. *Theoretical and Applied Genetics* (EE.UU) 65(1):73-76.
- PURSEGLOVE, I. 1981. Tropical crops: Monocotyledons. New York, Academic press. 597 p.
- ROMAN, M.; MANZANO, M.; LOPEZ, J. ; RODRIGUEZ, A. 1988. Estudio de la fertilidad del polen en cultivares de plátano (*Musa ssp*). *Ciencia y Técnica en la Agricultura* (Viandas Tropicales) (Cuba) 11(1):17-30.
- ROWE, P. 1985. Mejoramiento de bananos y plátanos. Trad. Vielka Chang-Yau. Panamá, UPEB. 19 p.
- SANFORD, J. C. ; CHYI Y.S.; REISCH, B. I. 1983. An attempt to induce "Egg transformation" in *Lycopersicon esculentum* Mill. using irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics* (EE.UU.) 67(6):553-558.

- SANNASGALA, K. 1989. *In vitro* somatic embriogenesis in *Musa*. Ph D Thesis. Belgica, Katholieke Universiteit Leuven 171 p.
- SCHMUCKER, T. 1935. *Planta* 23:264-283.
Citado por: Vasil, I. K. 1987. Physiology and culture of pollen. *International review of cytology* (EE.UU.) 107:137.
- SHEPHERD, K. 1954. Seed fertility of Gros Michel bananas in Jamaica. *Journal of horticultural science* (Inglaterra) 29(1):1-11.
- ; FERREIRA, F.C. 1982. The Papua New Guinea Biological Foundation's banana collection at Laloki, port Moresby. PNE/ACPE/IBPGR. 130 p.
- ; LAYOLA, D.; ALVES, E. 1986. Mejoramiento genético del banano. Trad. Nitzia Barrantes. *In* Mejoramiento genético de banano y plátano en Brazil y Honduras. Panamá, UPEP. p 1-19.
- SIMMONDS, N. W. 1948. Genetic and citological studies of *Musa*. 10. Stomatal size and plant vigour in relation to polyploidy. *Journal of Genetics* (India) 49:57-58.
- ; SHEPHERD, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean society of London. Botany* (Inglaterra) 55(359): 303-312.
- . 1962. The evolution of bananas. New York, J. Wiley. 170 p.
- . 1973. Los Plátanos. Barcelona, Editorial Blume. 539 p.
- SOTO, B. M. 1990. Bananos: Cultivo y comercialización. 2 ed. San José, Costa Rica, Litografía e Imprenta Lil. 627 p.

STOVER, R. H.; BUDDENHAGEN, I. W. 1986. Fitomejoramiento del banano: poliploidia, resistencia a enfermedades y productividad. *In* Mejoramiento genético de banano y plátano en Brazil y Honduras. Panamá, UPEP. p. 20-55.

----- ; SIMMONDS, N. W. 1987. Bananas. 3 ed. New York, Longman. 468 p.

VASIL, I. K. 1960. Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. *American Journal of Botany* (EE.UU.) 47(4): 239-246 p.

----- . 1964. Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth. *In* Pollen Physiology and Fertilization. Ed. H. F. Linskens. amsterdam, North-Holland publishing. p 107-119.

----- . 1987. Physiology and culture of pollen. *International review of cytology* (EE.UU.) 107:127-174.

IX. ANEXOS.

Anexo 1.

Colorante de Alexander.

Etanol absoluto	10 ml.
Verde malaquita (1% en etanol 95%)	1 ml.
Agua destilada	50 ml.
Glycerol	25 ml.
Fuccina ácida	5 ml.
Orange G (1% en agua)	0,5 ml.
Acido acético glacial	1-4 ml.
(según espesor de la exina)	
Fenol	5 g.
Hidrato de cloral	5 g.

Anexo 2.

Diacetato de fluoresceína (DcF).

Solución A	2 mg DcF por ml de acetona.
Solución B	Sacarosa 5% en 10 mμ/L de CaCl ₂
Solución colorante	2 μl de la solución A en 1ml de la solución B.

Anexo 3.

Medio de germinación del polen
(medio del CIRAD modificado).

Agar	1,0%
Acido bórico (H_3BO_3)	0,02%
Nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$)	0,02%
Sulfato de magnesio	0,02%
sacarosa	9,0%
pH	7,0
Agua	

Anexo 4.

Colorante "Z".

Una parte de anilina azul al 1% en agua.

Dos partes de detergente líquido.

Siete partes de K_3PO_4 0,2 M.

Una parte de NaOH 1 N.

Hervir 15-20 min.

Conservar en una solución de anilina azul al 0,1%
en K_3PO_4 0,1 M.

Anexo 5.

Medio de Murashige y Skoog (MS), 1962.

Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1650,0	mg/l
Acido bórico (H_3BO_3)	6,3	mg/l
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440,0	mg/l
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025	mg/l
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8	mg/l
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370,0	mg/l
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16,9	mg/l
Ioduro de potasio (KI)	0,83	mg/l
Nitrato de potasio (KNO_3)	1900,0	mg/l
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	190,0	mg/l
Sal sódica de etilen dinitril tetracetato ($\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$)	37,3	mg/l
Molibdato de sodio (MoNa_2O_4)	0,25	mg/l
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8,6	mg/l

Anexo 6.

Colorante DAPI.

Solución madre: 4'6 Diamino -2 fenilindol DiHCl (DAPI) a razón de 1mg/ml de H₂O.

Tampon Citrato/Fosfato (0.1M/0.2M): 12,29 ml de ácido cítrico M/10, y 7,71 ml de fosfato disódico M/5.

Solución colorante: 1 µl de la solución madre, por cada ml de la solución tampon, 1% de triton.

Anexo 7.

Citometría en Flujo (CMF).

La citometría en flujo (CMF) es una técnica de análisis de célula llevadas por un flujo líquido. Permite un conteo de células y la medida de intensidad de fluorescencia. Si la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN, se pueden hacer medidas cuantitativas. La fuente luminosa de excitación corresponde a un laser de argón.

El material vegetal usado puede ser: hojas, callos, meristemas, embriones, etc.

Los núcleo estudiados deben estar en suspensión. Para eso, el material vegetal se pica rápidamente en un tampon enfriado a fin de liberar los núcleos. Para una mejor penetración del colorante en los núcleos, se utiliza el TRITON.

Los fluorocromos más utilizados son los intercalantes debido al buen rendimiento y la buena absorción de fuentes luminosas (480 nm) que dan.

Las células aisladas en suspensiones, se someten a una superpresión que les permite progresar hacia una vena líquida de tracción. Las células desfilan a 10 m/seg. Son interceptadas por un rayo de luz excitadora incidente.

Las medidas deben realizarse sobre un número importante de núcleos (2000).

Las medidas de intensidad de fluorescencia correspondiente a cantidades de ADN se expresan en unidades arbitrarias. Para tener su significado, esos valores deben ser comparados con valores de referencia definidos de un testigo.

Esta técnica permite la determinación del tamaño de un genoma y entonces la apreciación del nivel de ploidía de los núcleos estudiados en comparación con un testigo de ploidía conocida.