

# PROBLEMAS EN LA HIBRIDACION INTERESPECIFICA DEL GENERO *Phaseolus*: ABORTO DEL EMBRION. ENSAYO PRELIMINAR DE CULTIVO DE EMBRIONES

L. Carmenza Muñoz F.\*  
Rigoberto Hidalgo \*\*

## COMPENDIO

Los programas de mejoramiento del frijol común (*P. vulgaris*) han encontrado limitantes en la estrecha variabilidad del acervo genético primario de esta especie (el cual incluye las formas cultivadas, mejoradas o no) para resistencia o tolerancia a enfermedades e insectos, así como a factores climáticos adversos. Debido a estos limitantes, los mejoradores han empezado a estudiar la posibilidad de transferir genes de otros acervos genéticos del género (secundarios, terciarios y aun cuaternarios) sin embargo esto implica la superación de algunas barreras genético-fisiológicas. El presente trabajo es la base preliminar de un proyecto a largo plazo (3 - 5 años) de cruces interespecíficos a nivel de especies cultivadas del género *Phaseolus*: *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *P. coccineus* y *P. lunatus*. Su objetivo principal es el encontrar metodologías prácticas que permitan la hibridación interespecífica.

## ABSTRACT

The breeding programs of the common bean (*P. vulgaris*) have met many restrictions which make difficult an increase in yield. These limitations refer to the narrow variability found in the primary pool of this species (which includes all the cultivated forms, improves of not) of resistance or tolerance to diseases and insects, such as the resistance to adverse environmental conditions. Because of all these limitations, breeders have begun to study the possibility of transferring genes from others genetic pools of the same genus (secondary, tertiary and even quaternary). This project is the preliminary basis of a long-term project (3 - 5 years) of interspecific crosses between cultivated species of the genus *Phaseolus*. Its main purpose is to find practical methodologies that will permit interspecific hybridization.

---

\* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

\*\* Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, A.A. 6713, Cali. Colombia.

## 1. INTRODUCCION

Cuatro especies del género **Phaseolus** se cultivan como leguminosas de grano (CIAT, 3): **P. vulgaris** L. (frijol común), **P. coccineus** L. (frijol ayocote) con dos subespecies **P. coccineus** sbsp. **coccineus** y **P. coccineus** sbsp. **polyanthus**, **P. lunatus** L. (frijol lima) y **P. acutifolius** A. Gray (frijol tepary). El frijol común es la especie cultivada mas importante y se encuentra ampliamente distribuido (CIAT, 4). No obstante su importancia y el potencial de producción (4 t/ha), en el país el promedio del rendimiento es de sólo 600 kg/ha (CIAT, 3).

Se han establecido programas de investigación para obtener genotipos mas adaptados e intensificar la producción. Uno de los principales inconvenientes encontrados se origina en la falta de suficiente variabilidad del acervo de genes primarios de **P. vulgaris**, para características como la resistencia a plagas y enfermedades, mejor arquitectura vegetal o adaptaciones fisiológicas. La necesidad de incrementar la variabilidad genética ha conducido a la hibridación interespecifica para hacer uso del acervo de genes secundarios (Prendota, Baudoin y Marechal, 7), pero las investigaciones han estado limitadas por el alto grado de incompatibilidad genética que existe entre las especies (Miranda, 6).

Como el principal problema que genera la hibridación interespecifica en el género **Phaseolus** ha sido el aborto prematuro de los embriones (Smartt, 8), este trabajo se concentrará en identificar, describir y cuantificar los problemas de aborto de embriones en los cruzamientos interespecificos entre **P. vulgaris**, **P. lunatus**, **P. coccineus** y **P. acutifolius** y en realizar pruebas preliminares de crecimiento de embriones en medios de cultivo artificiales.

## 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 2.1. Cruzamientos interespecificos.

El estudio se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, con los siguientes genotipos parentales: **Phaseolus vulgaris** (Rojo de seda, G04090; Diacol calima, G04494; H<sub>1</sub> mulatino, G05054; ICA Pijao, G05773 y Flor de mayo, G05897), **Phaseolus acutifolius** (PI-31083, G40015; PI-313488, G40019; PI-319443, G40020; Oaxaca 43, G40035 y Sinaloa, G40126), **Phaseolus lunatus** (PNG-M-3, G25126; FA-12 (Bush), G25136; EUI-854, G25137; EUI-858, G25138 y Fava de moita, G25148) y **Phaseolus coccineus** sbsp. **coccineus** (Hammond's dwarf scarlet, G35155; Guatemala 1253 (Piloy), G35187 y Patol blanca, G35311).

Se realizaron tres siembras de los progenitores y un siembra de los posibles híbridos en condiciones de invernadero (25°C y 8 l o/o HR). Se sembraron tres semillas por materia y dos repeticiones por genotipo. El método de polinización empleado fue el de "hooking" o estigma-estigma (Buisland, 2). La dirección de los cruzamientos fue: *P. vulgaris* x *P. coccineus* subsp. *coccineus* y el recíproco, *P. vulgaris* x *P. acutifolius* y el recíproco y *P. vulgaris* x *P. lunatus* y el recíproco. Los cruzamientos se hicieron en todas las combinaciones posibles dentro de los genotipos de las cuatro especies.

Se midieron las variables fecha de floración y cosecha, número de polinizaciones por cruzamiento y totales, días de polinización a aborto, porcentaje de aborto de botones, flores y vainas, porcentaje de prendimiento por cruzamiento y total, número de vainas con semillas, número de semillas totales.

## 2.2. Cultivo de embriones.

Cuando las vainas empezaron a presentar los primeros síntomas de aborto se cosecharon, suministrándoles el siguiente tratamiento: se esterilizaron con etanol al 95 o/o durante un minuto, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1 o/o durante cinco minutos y se separaron los embriones. A dos medios de cultivo, que contenían los nutrientes minerales de Murashige Skoog, se agregaron sustancias orgánicas diversas: al primero se adicionaron sacarosa (30 g/l), mio-inositol (100 mg/l), tiamina-HCl (1 mg/l), ácido nicotínico (5 mg/l), piridoxina-HCl (0.5 mg/l) y glutamina (50 mg/l). Al segundo medio se agregaron sacarosa (20 g/l), BAP (0.04 mg/l), GA (0.05 mg/l), ANA (0.02 mg/l), tiamina (10 mg/l) y mio-inositol (12.5 mg/l). El pH de los medios se ajustó a 5.7.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. Primera siembra.

Se utilizaron cinco genotipos de *P. vulgaris*, *P. acutifolius* y *P. lunatus*, y tres genotipos de la subsp. *coccineus*. Por el elevado número de materas (18) y de plantas (6 por genotipo) al intentar polinizar ocurrió caída de flores y el seguimiento de los botones polinizados fue difícil de llevar a cabo. Además, como la floración no fue homogénea se afectó el número de polinizaciones y por ende el porcentaje de éxito de la hibridación.

Para un total de 108 plantas, sólo se realizaron 83 polinizaciones (Cuadro 1), de las cuales 24 fueron de *P. vulgaris* x subsp. *coccineus* (y el recíproco), 16 de *P. vulgaris* x *P. acutifolius* (y el recíproco) y 43 de *P. vulga-*

Cuadro 1

Resultados preliminares y cuantificación de algunas variables en la primera siembra

Cruzamiento	No. polinizaciones	Prendimiento	No. vainas abortadas > 3 cm	No. vainas cosechadas	No. vainas con semilla	No. semilla total
<i>P. vulgaris</i> x Subsp. <i>coccineus</i>	8	0	.	.	.	.
Subsp. <i>coccineus</i> x <i>P. vulgaris</i>	16	2 (12.25 o/o)	2	.	.	.
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. acutifolius</i>	7	1 (14.28 o/o)	1	.	.	.
<i>P. acutifolius</i> x <i>P. vulgaris</i>	9	5 (55.55 o/o)	2	3	2	4
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. lunatus</i>	17	3 (17.64 o/o)	1	2	2	7
<i>P. lunatus</i> x <i>P. vulgaris</i>	26	2 ( 7.69 o/o)	2	.	.	.
Total	83	13	8	5	4	11

No se realizaron polinizaciones en: G40020, G40035 (*P. acutifolius*) y G35187 de la subsp. *coccineus*.  
El número máximo de polinizaciones/genotipo fue de 12 y el mínimo de 1.

ris x **P. lunatus** (y el recíproco). Se registró aborto muy temprano de botones y flores (87.5 o/o) y sólo 13 vainas lograron iniciar un crecimiento aparentemente normal, abarcando muestras de **P. vulgaris** por todas las tres especies, ocho de los cuales abortaron desde los 11 días siguientes a la polinización.

En los cruzamientos **P. lunatus** x **P. vulgaris**, algunas vainas iniciaron el crecimiento y fueron retenidas por las plantas desde los 11 hasta los 24 días después de la polinización; resultados que difieren de los enunciados por Al-Yasiri y Coyne (1) y por Homma y Heecket (5).

### 3.2. Segunda siembra.

Se utilizaron cinco genotipos de **P. vulgaris**, **P. acutifolius** y **P. lunatus**. La subsp. **coccineus** no se empleó porque presentó abscisión de flores. Se redujo el número de materas (15) y el de plantas (2 por pote). La siembra por etapas de los genotipos permitió obtener una floración homogénea, realizar un número mayor de polinizaciones con la selección adecuada de los botones y las flores.

El número de polinizaciones fue 154 (Cuadro 2). En los cruzamientos **P. vulgaris** x **P. acutifolius** (y el recíproco) se hicieron 60 polinizaciones y 94 en **P. vulgaris** x **P. lunatus** (y el recíproco). Se observó inicio de crecimiento en 39 vainas (25.3 o/o) de los cruzamientos **P. vulgaris** x **P. acutifolius** (y el recíproco), **P. vulgaris** x **P. lunatus**, y el mayor número se obtuvo cuando **P. vulgaris** se utilizó como progenitor femenino. Alcanzaron la madurez seis vainas de **P. vulgaris** x **P. acutifolius**, seis del cruce recíproco y siete de **P. vulgaris** x **P. lunatus**, presentando el mayor número de vainas abortadas (12) en el cruce **P. vulgaris** x **P. acutifolius**. Los resultados sugieren que sería más útil para este cruzamiento aplicar la técnica de cultivo de embriones con el objetivo de regenerar plantas  $F_1$ .

El mayor porcentaje de aborto para todos los cruzamientos se presentó en estado de botón (Fig. 1), lo cual fue más notorio cuando **P. acutifolius** y **P. lunatus** se usaron como progenitores femeninos, puesto que sus botones florales son más pequeños. En los cruces **P. lunatus** x **P. vulgaris** el aborto de botones y flores representó casi el 92 o/o del aborto total y las vainas que iniciaron su formación posteriormente abortan.

El mayor porcentaje de aborto en vainas con una longitud superior a 3 cm se presentó en **P. vulgaris** x **P. acutifolius** (38.7 o/o); en los cruzamientos **P. vulgaris** x **P. lunatus** y **P. acutifolius** x **P. vulgaris** este porcentaje representó cerca del 10 o/o del total. En **P. lunatus** x **P. vulgaris** ninguna alcanzó esta longitud.

Cuadro 2

Resultados y cuantificación de las variables definidas para la segunda siembra

Cruzamiento	No. polinizaciones	Prendimiento	No. vainas abortadas > 3 m	No. vainas cosechadas	No. vainas con semilla	No. semillas total
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. acutifolius</i>	31	18 (58.06 o/o)	12	6	3	4
<i>P. acutifolius</i> x <i>P. vulgaris</i>	29	9 (31.03 o/o)	3	6	5	17
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. lunatus</i>	48	12 (25.00 o/o)	5	7	7	25
<i>P. lunatus</i> x <i>P. vulgaris</i>	46					
Total	154	39(25.32 o/o)	20	19	15	46

El número máximo de polinizaciones/genotipo fue de 24 y el mínimo de una.

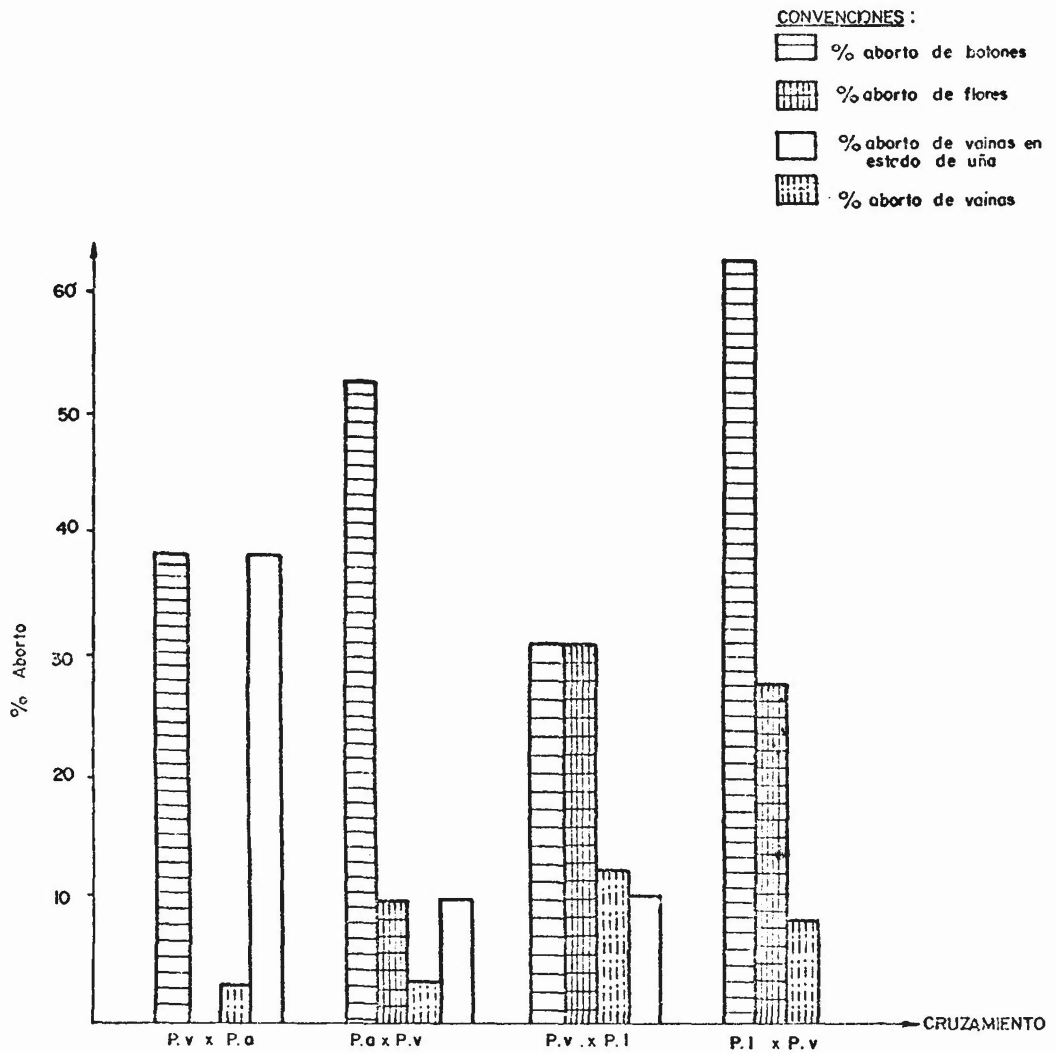


Fig. 1. Estructuras abortadas (o/o) en cada cruzamiento en la segunda siembra

En esta siembra el mayor éxito (20 o/o) se alcanzó en los cruzamientos **P. vulgaris** y **P. acutifolius**, la dirección de cruzamiento no afectó la tasa de éxito.

### 3.3. Tercera siembra.

La siembra de los genotipos parentales fue escalonada y se conservó la distribución del ensayo anterior. Además, se sembró una muestra de 24 semillas de posibles híbridos, observándose como características generales la autofertilidad y la semejanza de estos individuos con el progenitor materno.

El número de polinizaciones realizadas fue de 136, sólo 31 vainas iniciaron el crecimiento y alcanzaron una longitud superior a 3 cm (Cuadro 3) y 18 llegaron a la época de madurez fisiológica.

En todos los cruzamientos el mayor porcentaje de aborto ocurrió en estado de botón, al igual que en la segunda siembra fue más elevado cuando **P. acutifolius** (59 o/o) y **P. lunatus** (66 o/o) fueron los progenitores maternos (Fig. 2). En todos los cruces, el aborto en estado de botón y flor representó aproximadamente el 70 o/o del aborto total. El mayor porcentaje de aborto en vainas (3 cm) se presentó en **P. vulgaris** x **P. acutifolius** (20.5 o/o), en el recíproco fue de 2.56 o/o y en **P. vulgaris** x **P. lunatus** de 9.5 o/o, en este recíproco ninguna vaina alcanzó esta longitud. El mayor porcentaje de éxito (30.8 o/o) se logró en **P. acutifolius** x **P. vulgaris**, resultado que coincide con los de algunos investigadores.

### 3.4. Cultivo de embriones.

Para el cultivo in vitro de los embriones híbridos se cosecharon 20 vainas: siete del cruce **P. vulgaris** x **P. acutifolius** y una del recíproco, cinco de **P. vulgaris** x **P. lunatus** y siete del recíproco. Las vainas contenían 52 embriones.

En los dos medios de cultivo hubo respuesta de algunos embriones. Sólo una planta sobrevivió y llegó hasta producción, esta planta, posible híbrido  $F_1$ , provenía del cruzamiento **P. vulgaris** x **P. lunatus**.

## 4. CONCLUSIONES

- 4.1. Utilizando una amplia gama de genotipos (diferente origen, tipo de semilla, hábito de crecimiento) de las especies de **Phaseolus**, es posible incrementar notablemente la obtención de híbridos interespecíficos.



Cuadro 3

Resultados y cuantificación de algunas variables definidas para la tercera siembra

Cruzamiento	No. polinizaciones	Prendimiento	No. vainas abortadas > 3 cm	No. vainas cosechadas	No. vainas con semilla	No. semillas
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. acutifolius</i>	39	11 (28.2 o/o)	8	3	1	4
<i>P. acutifolius</i> x <i>P. vulgaris</i>	39	13 (33.3 o/o)	1	12	9	32
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. lunatus</i>	42	7 (16.3 o/o)	4	3	3	8
<i>P. lunatus</i> x <i>P. vulgaris</i>	47		.	.	.	.
Total	167	31 (18.56 o/o)	13	18	13	44

El número de polinizaciones/genotipo fue de 26 y el mínimo de dos.

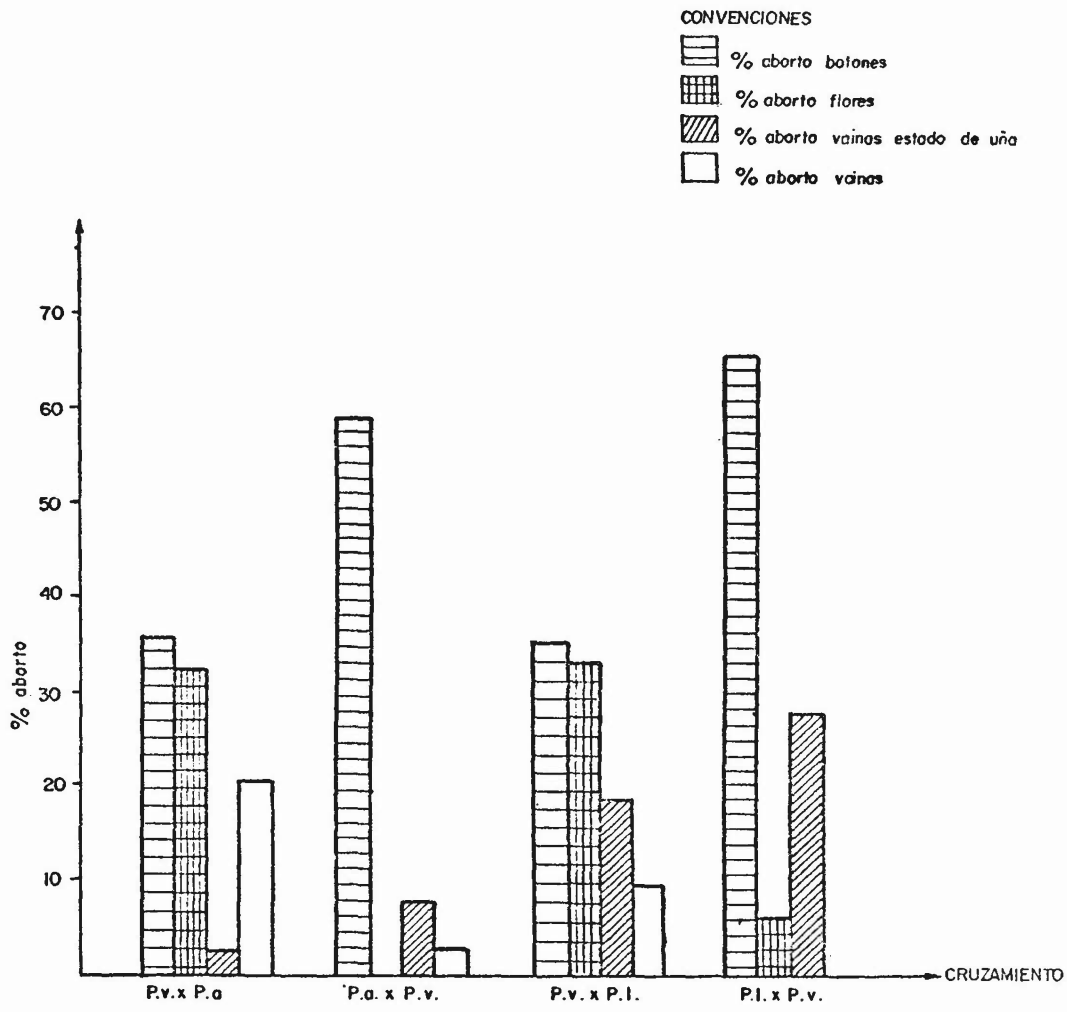


Fig. 2. Estructuras abortadas (o/o) en cada cruzamiento de la tercera siembra.

- 4.2. Para aumentar la probabilidad de éxito del cruce es necesario afinar la metodología en cuanto a descripción de la floración, disposición de los materiales en el invernadero, utilización de materiales adaptados a la zona, realización del número mayor de polinizaciones en las especies cultivadas más distantes genéticamente de **P. vulgaris**, como por ejemplo **P. lunatus**.
- 4.3. Existe potencial promisorio del cultivo de embriones para incrementar la población  $F_1$  sin embargo se necesita investigar con más detalle los requerimientos nutritivos de los embriones híbridos y la composición del medio de transplante.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. AL-YASIRI, S. A.; COYNE, D. F. Interspecific hybridization in the genus **Phaseolus**. Crop Science v. 6, n. 1, p. 54-60. 1966.
2. BUISSHAND, T. The crossing of **Phaseolus** species. Euphytica. v. 5, p. 41 - 50. 1956.
3. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Problema de campo en los cultivos de frijol de América Latina. Cali, 1978.
4. —————. Morfología de la planta de frijol común (**P. vulgaris**). Cali, 1984 (Unidad audiotutorial).
5. HONMA, S.; HEECKET, O. Interspecific hybridization between **P. vulgaris** and **P. lunatus**. Journal Heredity v. 50, p. 223 - 237. 1959.
6. MIRANDA, C. Infiltración genética entre **P. coccineus** L. y **P. vulgaris**. Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de post-graduados serie de investigaciones n. 9. 1967. 48 p.
7. PRENDOTA, K; BAUDOIN, J. P.; MARECHAL, R. Fertile allopolyploides from the cross **P. acutifolius** x **P. vulgaris**. Bulletin des recherches Agronomiques de Gembloux. v. 17, n. 2. p. 177-190. 1982.
8. SMARTT, J. Interspecific hybridization between cultivars american species of the genus **Phaseolus**. Euphytica. v. 19, p. 480-489. 1970.