

PROGRESOS Y PROBLEMAS ASOCIADOS CON LA HIBRIDACION INTERESPECIFICA DENTRO DEL GENERO PHASEOLUS

A.P. Lorz *

Comenzaremos esta presentación con una tentativa de arreglar las especies más familiares de Phaseolus en cuatro grupos de acuerdo con nuestra apreciación de las relaciones taxonómicas y de la compatibilidad de cruzamiento.

Grupo 1

- P. vulgaris
P. lunatus
P. vulgaris
(subsp. aborigineus)
P. coccineus
P. polyanthus
P. polystachyus
P. acutifolius
P. glabellus
P. xanthotrichus (= vulgaris ?)
P. dumosus (= vulgaris ?)
P. metcalfei

Grupo 3

- P. Caracalla
P. speciosus

Grupo 2

- P. bracteatus
P. lathyroides
P. atropurpureus
P. geophilus
(= atropurpureus ?)

Grupo 4

- P. aureus
P. angularis
P. aconitifolius
P. calcaratus
P. mungo
P. trilobus
P. trinervius
P. radiatus

* Departamento de Horticultura, Universidad de Florida.

El Grupo 1 está representado por "endémicos" americanos de los cuales P. vulgaris ha sido cruzado con cada uno de los otros miembros del grupo excepto con P. polystachyus y P. metcalfei.

El Grupo 2 está representado por tres o cuatro especies con similar morfología floral y se cree que son originarios de varias islas tropicales. Debido a la aparente similitud de la morfología floral entre este grupo y el Grupo 1, pareciera que hay una mejor oportunidad para cruzar miembros de estos dos grupos, que tratar de cruzar los grupos 1 y 4.

El Grupo 3 está representado por dos especies con flores grandes cuyo origen es América Central y América del Sur, las cuales difieren claramente una de la otra y del Grupo 1, y que han opuesto resistencia, hasta la fecha, a todos nuestros esfuerzos para cruzarlos con miembros del Grupo 1.

El Grupo 4 comprende principalmente especies asiáticas con características morfológicas marcadamente diferentes de aquellas del Grupo 1, mientras que exhiben, al mismo tiempo, marcada semejanza con algunos cultivares de Vigna sinensis, sugiriendo una posible relación con este género de "cow pea" (frijol o chícharo de vaca).

Los representantes de los Grupos 2, 3 y 4 parecen tener poca o ninguna compatibilidad en cruzamientos con miembros del Grupo 1 como ha quedado indicado no solamente por el fracaso en las tentativas para alcanzar tales cruzamientos, como por haberse corroborado en ciertos estudios de inmunidad química por Kloz (7, 8), Klozova y Kloz (9), y Klozova (10). No parece probable que alguien haya podido duplicar el cruce de P. vulgaris P. mungo realizado por Strand (14), y, a la luz de este precedente, la repetición de este cruzamiento parecería deseable. Nuestras propias tentativas para repetir este cruzamiento se han enfrentado a fracasos persistentes, como también ha sucedido

con nuestras tentativas para intercruzar miembros del Grupo 1 con miembros del Grupo 2. Sin duda, el futuro más importante para la introducción del germoplasma de especies exóticas de Phaseolus está en el intercruzamiento de los ya familiares miembros del Grupo 1 y en un mayor esfuerzo para localizar los endémicos americanos menos conocidos, que pueden clasificarse como tales, de modo que los suministros de semillas de éstos puedan establecerse y distribuirse a los genetistas de frijol.

Informe general de progreso

No trataremos de presentar aquí una revisión exhaustiva del progreso en hibridación interespecífica. Deseamos solamente presentar una breve reseña de los tipos de cruzamiento que se han informado y citar al menos una autoridad en todos los casos.

Cruzamientos Interespecíficos de Especies de Phaseolus Occidentales

<u>Tipo de cruzamiento</u>	<u>Autoridad</u>	<u>Notas</u>
<u>Acutifolius</u> x <u>coccineus</u>	Coyne (1) 1964	F ₁ Esteril, no RC ^a
x <u>F₁ of cocc.</u>	Coyne (1) 1964	F ₁ Esteril, no RC
x <u>vulgaris</u>		
<u>Vulgaris</u> x <u>acutifolius</u>	Honma (3) 1956	F ₁ Cultivadas de Embrión F ₃ Obtenida
" x <u>coccineus</u>	Muchas	F ₁ Variable, esteril a parcialmente fértil
" x <u>glabellus</u>	Lorz (12) 1957	Similar a los cruces tipo <u>P. coccineus</u>
" x <u>lunatus</u>	Honma & Heeckt 1959 (5)	F ₃ y retrocruces, tipos progenitores no recuperados

<u>Tipo de cruzamiento</u>	<u>Autoridad</u>	<u>Notas</u>
" <u>x polyanthus</u>	Lorz (12) 1957	F1 y RC alrededor de 50% fértil, vigorosa
" <u>x xanthotrichus</u>	Lorz (12) 1957	Xanthotrichus = vulgaris ?
<u>Coccineus x lunatus</u>	Honma & Heeckt (4) 1958	F1 auto-incompatible, no RC, F2 informada
" <u>x polyanthus</u>	Resultados actuales	F1 50% a 100% fértil, excelentes posibilidades para uso en cruces de tres especies

a) RC = retrocruza

Históricamente, la mayor parte del trabajo original en hibridación de especies ha involucrado P. vulgaris y P. coccineus (multifloral), y se remonta al tiempo de Mendel (Coyne 1). El cruzamiento se ha realizado tantas veces, por tantos investigadores, que citar un autor no tiene caso. El cruce se obtiene fácilmente en ambas direcciones y tiene poco valor práctico en cualquier variedad comercial de frijol vainica (ejotero). Se ha informado que puede ser directamente conectado al ancestro correspondiente a P. coccineus. Las posibilidades para la introducción de caracteres valiosos de esta especie permanecen aún grandemente inexploradas. En vista de la naturaleza polimórfica de P. coccineus, estas posibilidades parecen no tener límite y es realmente recomendable realizar más trabajos a este respecto. El cruzamiento interespecífico no es en general fácil; lo evidencia el hecho de que, aparte de cruzamientos del tipo vulgaris x coccineus, no se ha realizado aparentemente otra combinación de cruce interespecífico antes que el cruce de P. vulgaris x P. mungo informado por Strand (14), en 1943. Ningún otro cruce se ha hecho involucrando endémicos estrictamente americanos hasta

el que informamos nosotros en 1952 en que se informó sobre el cruce de P. lunatus y P. polystachyus, Lorz (11).

Sin embargo, desde entonces, el desarrollo de nuevas técnicas y conceptos combinados con considerable perseverancia, han dado como resultado nuevas combinaciones.

En este trabajo se encontró esterilidad que variaba en diferentes grados desde 0 hasta cerca de 100%. Esta situación, naturalmente, pone obstáculos a los esfuerzos para extraer caracteres útiles de las especies exóticas y, con el mejoramiento del frijol de vainica en particular, es difícil evaluar las características de las vainas cuando solamente se desarrolla una o dos semillas, en lugar del complemento entero.

Probablemente mucho del material, potencialmente valioso se ha eliminado a causa de ésto, por lo cual se recomienda más perseverancia en el futuro para seguir este material, aparentemente indeseable, a través de varias generaciones, con la esperanza de que las recombinaciones genéticas que han tenido menos éxito sean gradualmente eliminadas, dando paso a las que sí han tenido más éxito y han sido más fértiles, las cuales pueden entonces ser propiamente evaluadas ya sea como un producto final o como un derivado que se considera útil para mejoramientos futuros.

Ayudas técnicas para el cruzamiento

La ejecución de cruzamientos entre especies poco afines se ha considerado un reto al ingenio del mejorador de plantas y se han usado muchos medios para intentar superar la incompatibilidad en el cruzamiento.

1. El aborto de embriones ha sido obviado con el cultivo de embriones y lo que llamamos el seudo-cultivo de embrión. Hemos tenido un cierto éxito en el cultivo de embriones mediante el uso de una adaptación de la técnica de Yeates (15), en forma simplificada, utilizando como nutriente una parte de fertilizante comercial completo (Hyponex, Hygro, etc.), doce partes de sucrosa y 600 partes de agua. Hemos

encontrado conveniente el usar como medio nutritivo arena pura lavada y saturada con el nutrimento en un tubo de prueba cubierto como un vaso de Petri, con otro tubo de prueba invertido del tamaño siguiente en diámetro. La arena es preferible a otros medios de cultivo de menor peso porque hay una menor tendencia del cultivo a formar burbujas durante la presión de esterilización de 12 libras por 20 minutos. Se ha cultivado de esta manera embriones tan pequeños como de 2 milímetros de diámetro. Una vez establecidos los embriones se transfieren a un medio de cultivo previamente esterilizado, para esto se frota primero la base del tubo contra la rueda de un cortador de vidrio fijo. Cuando se ha removido la base del tubo de vidrio, aún con su tapa, se coloca en una depresión hecha por la presión de un tubo no cortado, del mismo tamaño, en el medio del cultivo. Con embriones más grandes o semillas jóvenes, alrededor de una tercera parte de su tamaño normal o más grandes, no se usa nutrimento y en consecuencia no es necesario un cuidado estrictamente aséptico. Este cultivo de pseudo-embriones necesita la simple colocación del embrión en el filo superior de una lámina de plástico enrollada en papel higiénico con la base de la lámina sumergida en agua alrededor de una pulgada dentro de un frasco tapado. Este es un sistema que economiza espacio ya que los embriones de muchos cruces diferentes pueden colocarse en el mismo frasco.

2. Otro dispositivo para solucionar la incompatibilidad en cruzamientos interespecíficos requiere de la utilización de la diversidad de gametos que resultan del uso de polen de cruzamientos intra-específicos amplios basándose en la teoría de que las oportunidades de éxito son mayores, con un amplio rango de potencialidades, en una mezcla segregante de gametofitos masculinos, que con el estrecho rango de un grupo de gametofitos haploides uniformes, todos del mismo genotipo. La experiencia también indica que las plantas híbridas intra-específicas altamente heterocigotas no son solamente mejores progenitores de polen, sino que también son mejores progenitores de semilla, que los individuos homocigotos.

3. Para impedir la abcisión de las vainas, hemos seguido el cruzamiento con auto fecundación deliberada, después de doce horas de intervalo, y hemos aplicado también reguladores del crecimiento, en gotitas, en el receptáculo de la flor. Para esto hemos usado un medio básico compuesto de una parte de glicerina y cuatro partes de jarabe (karo) en el cual se disuelven hasta saturación los ácidos indolbutírico y parafenoxiacético como lo hiciera Jyotishi (6).
4. En relación con la metodología del retrocruzamiento, la experiencia nos dice que el uso del polen de un híbrido sobre estigmas de cultivares comerciales es generalmente más satisfactorio que tratar de usar el híbrido como planta hembra. Cuando el híbrido casi estéril es capaz de producir por ejemplo 5% de polen bueno, todos los granos de polen funcionales sobre el estigma de la flor de una variedad estándar tienen la potencialidad de unión gamética con un arreglo de óvulos que contienen 100% de huevos viables. Sin embargo, el recíproco involucraría el uso de 100% de polen bueno de un cultivar comercial sobre el pistilo de una flor híbrida cuyo potencial para la producción de óvulos con huevos viables es solamente el 5% de un máximo de 8. En consecuencia, hay solamente una pequeña oportunidad de que cualquier flor seleccionada de un híbrido contenga un óvulo funcional.

Hibridación interespecífica en la Universidad de Florida

Hasta el presente, estamos tratando de establecer una población de genes provenientes de tantas especies como seamos capaces de cruzar con P. vulgaris. En este trabajo, hemos usado cultivares de tipo arbustivo y de guía de P. vulgaris y P. coccineus, así como dos introducciones de P. polyanthus. Este año hemos obtenido semilla buena de P. acutifolius polinizada por varios heterocigotas del complejo original de P. vulgaris, P. coccineus y P. polyanthus. Parece haber una buena posibilidad que, con la ayuda de la ahora abundante diversidad genética disponible, P. lunatus pueda también ser incorporada dentro del complejo.

Un caso interesante involucra un híbrido fértil de un cruce de un fenotipo arbustivo de P. coccineus con P. polyanthus. El polen abundante de este híbrido florífero y vigoroso provee una fuente disponible para mucha diversidad gamética para uso en cruzamientos con otras especies. Usando polen de este híbrido así como también de híbridos de P. vulgaris x P. coccineus y de P. vulgaris x P. polyanthus, estamos produciendo semilla en P. acutifolius y P. lunatus. La autenticidad de tales cruces, sin embargo, queda por establecerse a través de herencia de caracteres atribuibles a la fuente de polen.

El cruce de P. lunatus y de P. polystachyus no es difícil si uno es capaz de lograr la floración simultánea de las dos especies y si se usa P. lunatus como progenitor femenino. Los híbridos F₁ son casi completamente estériles, pero las semillas raramente formadas, se desarrollan como anfidioploides fértiles con un número de cromosomas somáticos de 44 en lugar de 22. Se asume que como resultado de la falla en la sinapsis meiótica en la esporogénesis del híbrido F₁, se formaron diadas en lugar de tetradas, las cuales tienen 2x en lugar del número haploide x de cromosomas. Entonces la oportunidad de unión de dos gametos 2x produjo un cigoto 4x anfidioploide fértil de acuerdo con el siguiente diagrama:

<u>P. lunatus</u>	<u>P. polystachyus</u>
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	(1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	(1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11)

X

F_1 híbrido (99% estéril)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	(1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11)
-----	-----

No sinapsis, división mitótica, diadas de polen.

Unión de dos gametos no reducidos.

Doblamiento del complemento de cromosomas.

Establecimiento del F₂ anfidioploide P. "lunastachyus"

F₃ et seq. (fertilidad restaurada)

La citología y la distribución de frecuencia del tamaño de los granos de polen de los progenitores y ciertos derivados del cruzamiento fueron trabajados por Fozdar (2).

Con anfidiploides absolutos no hay sinapsis entre cromosomas de las dos especies. La anfidiploidia aquí no es absoluta, sino parcial o segmental de acuerdo con la terminología de Stebbins (13), lo apoya la observación de asociaciones secundarias, que indican la existencia de algunas homologías entre los genomios de las dos especies. Hay más evidencia genética corroborativa en la segregación de flores blancas y el hábito arbustivo, ya que ambos son caracteres recesivos derivados de P. lunatus. Esto no sería posible sin alguna sinapsis, al menos entre segmentos de cromosomas de las dos especies diferentes. El estudio de Fozdar (2), sobre el tamaño de los granos de polen de los progenitores y los anfidiploides provee evidencia para la correlación entre el doble número de cromosomas y la duplicación del volumen de la célula. El diámetro promedio de los granos de polen de los anfidiploides es aproximadamente el requerido de 1 y 1/4 veces aquel del promedio de las especies progenitoras diploides, para indicar doble volumen celular. El rango de variabilidad es también mayor en los anfidiploides como es de esperarse en la mayor posibilidad de irregularidades meióticas que producen cambios en el número de cromosomas, afectando por lo tanto el tamaño de la célula.

En un lapso de alrededor de cinco años, un considerable número de tentativas para retrocruzar los anfidiploides al progenitor P. lunatus ha tropezado con consistentes fracasos. Este año, con el uso de híbrido P. lunatus altamente heterocigotas como planta madre, hemos logrado alguna producción de vainas usando polen de "lunastachyus", pero es muy pronto para determinar el establecimiento de embriones o semillas viables, o la validez de los retrocruzamientos.

Si tal retrocruzamiento pudiera ser alcanzado, sería posible, de acuerdo con el diagrama, establecer una serie de aneuploides los cuales son básicamente P. lunatus pero que han agregado pares individuales de homólogos derivados de P. polystachyus.

Investigación proyectada

P. Zlunatus

~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ ~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11)
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 ~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11)

F1 ~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11)
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 - - - - - - - - - - - -

F2's ~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (1 - - - - - - - - - - - -)
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 (1 - - - - - - - - - - - -)

~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (- 2 - - - - - - - - - - - -)
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 (- 2 - - - - - - - - - - - -)

~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (- - 3 - - - - - - - - - - - -)
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 (- - 3 - - - - - - - - - - - -)

~~1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11~~ (- - - - - - - - - - - 11)
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 (- - - - - - - - - - - 11)

En cualquier programa de hibridación interespecífica, es imposible concebir por anticipado cuales serán los resultados en términos de interacción de factores y recombinaciones genéticas, en consecuencia se justifican cruzamientos puramente exploratorios. Hay, sin embargo, muchas maneras por las cuales las especies exóticas pueden contribuir al mejoramiento de cultivares comerciales de frijol.

Para mencionar unas pocas tenemos:

1. Incrementar la precocidad de ciertas formas arbustivas de P. coccineus.
2. Germinación hipógea de P. coccineus y P. polystachyus.
3. Aumento del vigor usando las formas de guía de P. coccineus, P. lunatus y P. polyanthus.
4. Resistencia a sequía y a bacteriosis de P. acutifolius.
5. Resistencia a virus del mosaico amarillo del frijol de algunas formas de P. coccineus.

6. Aumento en el tamaño de la vaina usando algunos P. coccineus y P. lunatus.
7. Inflorescencias racimosas de P. coccineus y P. lunatus.

Hemos recorrido un largo camino desde que descubrimos que la hibridación interespecífica en Phaseolus no estaba necesariamente limitada a cruzamientos entre formas de P. vulgaris y P. coccineus y, en conclusión, podemos solamente hacer énfasis en la necesidad de futuras exploraciones botánicas para poner a la disposición de futuros trabajos las más raras y menos conocidas especies de las cuales un considerable número permanecerá probablemente aún después de que muchas se eliminan a través de la duplicación y la sinonimia taxonómica.

LITERATURA CITADA

1. COYNE, D.P. Species hybridization in Phaseolus. Journal of Heredity 55: 5-6, 1964.
2. FOZDAR, B.S. Cytological investigation of parents, offspring and backcross derivatives involved in the interspecific cross, Phaseolus lunatus L. x P. polystachyus (L) B.S.P. University of Florida Doctoral Dissertation 1-112, 1962.
3. HONMA, S. A bean interspecific hybrid. Journal of Heredity. 47: 217-220, 1956.
4. _____ y O. HEECKT. A bean interspecific hybrid involving Phaseolus coccineus x P. lunatus. Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences. 72: 360-364, 1958.

5. _____ . Interspecific hybrid between Phaseolus vulgaris and P. lunatus. Journal of Heredity. 50: 233-237, 1959.
6. JYOTISHI, R.P. Use of growth regulating substances as an aid to hybridization of Phaseolus. University of Florida Doctoral Dissertation 1-123, 1960.
7. KLOZ, J. An investigation of the protein characters of four Phaseolus species with special reference to the question of their phylogenesis. Biol. Plant. 4 (2): 85-90, 1952.
8. _____ . Protein characters and their genesis in lower taxons. Prague, Proc. of Symposium on Mutational Process. 477-484, agosto 1965.
9. KLOZOVA, E. and KLOZ, J. The identification of hybrids of Phaseolus vulgaris L. x Phaseolus coccineus L. using immunochemical methods. Biol. Plant. 6 (3): 240-241, 1964.
10. KLOZOVA, E. Interrelations of several Asiatic species of the genera Phaseolus studied by immunochemical methods. Prague, Proc. of Symposium on Mutational Process. 9 (11): 485-487, agosto de 1965.
11. LORZ, A.P. An interspecific cross involving the lima bean, Phaseolus lunatus L. Science 115: 702-703, 1952.
12. _____ . Interspecific hybridization in Phaseolus at the University of Florida. Unpublished, but reported in First Annual Rept. Bean Imp. Coop. 16-17, 1957.
13. STEBBINS, G.L., Jr. Type of polyploids: their classification and significance. Advances in Genetics 1:403-429, 1947.

14. STRAND, A.B. Species crosses in the genus *Phaseolus*.
Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences 42: 569-573, 1943.
15. YEATES, I. S. The amateur breeder. Yearbooks of the American Lily Society 12-27, 1964.