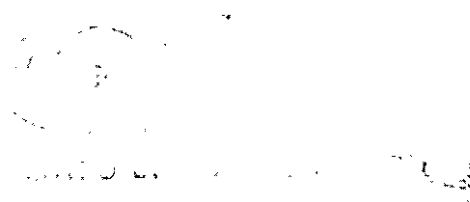
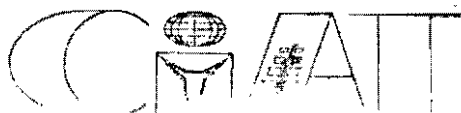


PROYECTO CIAT-U. DE GEMBLOUX (BELGICA)



~~INTRODUCCION A LAS HIBRIDACIONES INTERESPECIFICAS CON EL~~
FRIJOL COMUN, *Phaseolus vulgaris* L.


BIBLIOTECA
ADQUISICIONES - CANJE
26 FEB. 1981

PAUL GEPTS
Asociado de Investigación, CIAT
Experto Asociado, FAO

Diciembre, 1980

1.- Introducción.

El objetivo de este informe es de presentar una síntesis de los estudios llevados a cabo sobre las hibridaciones interespecíficas en el género Phaseolus con referencia especial a los cruces con P. vulgaris.

El hecho que algunos cultivos importantes (p.ej. algodón, trigo) se originaron por medio de cruces interespecíficos-muy antiguos-y la necesidad de aumentar la variabilidad genética de los cultivos, han sugerido el uso de hibridaciones interespecíficas para el mejoramiento de un alto número de cultivos y con objetivos muy distintos - aunque principalmente para obtener resistencias a enfermedades (Cuadro 1).

La mayoría de los cultivos mencionados en el cuadro 1 son cultivos alimenticios básicos de las regiones templadas (por ej. papa, trigo) o cultivos comerciales de las regiones tropicales y templadas (por ej. tabaco, tomate, palma africana, café). La ausencia de los cultivos alimenticios básicos tropicales de este cuadro puede explicarse por la naturaleza de los cruces interespecíficos. Un programa de hibridaciones interespecíficas generalmente es largo y más bien difícil, exigiendo inversiones comparativamente altas que han sido proporcionadas por entidades públicas o particulares que no estaban interesadas especialmente en los cultivos alimenticios tropicales.

La variabilidad del frijol común es notablemente deficiente en varios caracteres relacionados a la arquitectura vegetal y a

Cuadro 1. Ejemplos de cruces interespecíficos en fitomejoramiento

Cultivo	Cruces	Resultados	Referencia
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>L. esculentum</i> x <i>L. pimpinellifolium</i>	Resistencia a <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Stemphylium solani</i> .	Allard (1960)
	<i>L. esculentum</i> x <i>L. hirsutum</i>	Resistencia a <i>Septoria lycopersici</i>	"
	<i>L. esculentum</i> x <i>L. peruvianum</i>	Resistencia a <i>Septoria lycopersici</i>	"
Yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	<i>M. esculenta</i> x <i>M. glaziovii</i>	Resistencia a <i>Xanthomonas manihotis</i> , al mosaico africano.	Hahn (1978)
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>S. tuberosum</i> x <i>S. demissum</i>	Resistencia a <i>Phytophthora infestans</i> .	Rick (1967), Harlan (1976)
Café	<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i> var. Robusta = arabusta		De Marly (1978)

Cuadro 1. Ejemplos de cruces interespecíficos en fitomejoramiento (Continuación)

Cultivo	Cruces	Resultados	Referencia
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>T. aestivum</i> x <i>T. durum</i> <i>Aegilops ventricosa</i> x <i>T. persicum</i> x <i>T. aestivum</i> var. Marne = V.P.M.	Resistencia a roya Resistencia a <i>Cercospora herpotrichoides</i> .	Harlan (1976) Dosba & Doussinault (1977).
	Sin especificar	Esterilidad masculina citoplásmica.	Harlan (1976)
Algodón	<i>Gossypium hirsutum</i> x <i>G. thurberi</i>	Resistencia de la fibra	"
	Sin especificar	Esterilidad masculina citoplásmica.	"
Palma africana (<i>Elaeisguineensis</i>)	<i>E. guineensis</i> x <i>E. oleifera</i>	Hábito de crecimiento	De Marly (1978)
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>N. glutinosa</i>	Resistencia al Mosaico (TMV)	Akehurst (1968)
	<i>N. tabacum</i> x <i>N. debneyi</i>	Resistencia a <i>Thielaviopsis basicola</i> .	"
	<i>N. tabacum</i> x <i>N. longiflora</i>	Resistencia a <i>Pseudomonas tabaci</i>	"

la resistencia a enfermedades y plagas. Las hibridaciones interespecíficas con otras especies de Phaseolus, especialmente P. coccineus, podría constituir una fuente interesante de variabilidad adicional, si se puede superar las barreras de aislamiento que limitan la transferencia de genes de una especie a otra.

En este informe, se discutirán las etapas sucesivas de un programa de cruzamientos interespecíficos:

- 1.- Definición de los objetivos
- 2.- Estudios taxonómicos y de cruzamiento
- 3.- Establecimiento y evaluación de colecciones de germoplasma.
- 4.- Cruzamientos
- 5.- Restauración de la viabilidad y fertilidad en las progenies.
- 6.- Obtención de líneas interespecíficas.

Se pondrá en relieve las barreras que limitan el flujo de genes entre especies de Phaseolus y las formas de superarlas.

- 1.- Posibilidad de cruzamiento.
- 2.- Inviabilidad y esterilidad de los híbridos
- 3.- Modificaciones en las normas de segregación

2.- Objetivos

2.1.- Generales

La finalidad de un proyecto de hibridaciones interespecíficas es de crear una variabilidad nueva y adicional en la especie cultivada,^a especialmente mediante la transferencia a par-

^a el término especie cultivada se refiere a la especie principal, objeto del mejoramiento; el término especie silvestre se refiere a cualquier especie - cultivada o silvestre - que se está usando como fuente de variabilidad en cruces interespecíficos.

tir de especies silvestres hacia la especie cultivada de caracteres cuya variabilidad en la última es insuficiente o inexistente . El tipo y el número de caracteres buscados depende de algunos factores, tales como:

- Las deficiencias en la variabilidad de la especie cultivada: debido a las dificultades presentadas por los cruces interespecíficos, sólo deben seleccionarse esas características que son a la vez insuficientemente variables en la especie cultivada y que son consideradas como altas prioridades en su mejoramiento.
- La variabilidad de las especies silvestres: es aconsejable tener en cuenta todas las características potencialmente útiles de las especies silvestres. Por ejemplo, uno de los rasgos más interesantes del P. coccineus subsp. coccineus es su mecanismo de polinización cruzada. Pero esta subespecie tiene además otras características poco expresadas en el germoplasma de P. vulgaris y que podrían ser útiles en el mejoramiento, tal como: un sistema radicular bien desarrollado, un epicotilo largo, un racimo con pedúnculo largo y un alto número de inserciones florales, etc.

Generalmente un proyecto de hibridaciones interespecíficas no produce directamente variedades comerciales sino líneas que se usarán como progenitores en el mejoramiento de la especie cultivada.

2.2.- Específicos:

En el cuadro 2 se indican los objetivos del proyecto

de cruzamientos interespecíficos con P. vulgaris en CIAT.

En cuanto a la arquitectura vegetal, el mecanismo de polinización cruzada es la característica más importante, ya que permitiría un mejor aprovechamiento de la variabilidad genética del germoplasma de P. vulgaris y aumentaría la frecuencia de recombinaciones.

La resistencia al volcamiento asociada al hipocotilo y epicotilo largos prevendría una disminución de la capacidad fotosintética y limitaría la transmisión de patógenos del suelo al follaje, así como una reducción en el rendimiento causado por la pudrición de las vainas.

Racimos con un pedúnculo largo mantendrían las vainas fuera del follaje y disminuiría la transmisión de patógenos del follaje a las vainas.

Un alto número de vainas por racimo aumentaría directamente uno de los componentes del rendimiento del frijol común.

El estrés causado por falta de agua y/o el bajo contenido de fósforo en los suelos es una situación muy frecuente en muchas regiones tropicales, sobre todo porque el frijol tiende a ser desplazado a suelos marginales por cultivos comerciales.

Las 4 enfermedades y plagas mencionadas pueden afectar en alto grado el rendimiento del frijol común y no se han encontrado fuentes de resistencia satisfactorias en esta especie.

Cuadro 2. Objetivos específicos del proyecto de hibridaciones interespe-
cíficas con *P. vulgaris* en CIAT

<u>Arquitectura vegetal:</u>	Mecanismo de polinización cruzada Racimo con pedúnculos largos y alto número de vainas Hypocotilo y epicotilo largos Resistencia al volcamiento
<u>Tolerancia a :</u>	Sequía Bajos niveles de P.
<u>Resistencia a:</u>	Añublo bacterial común (<u><i>Xanthomonas phaseoli</i></u>) Mancha de Ascochyta (<u><i>Ascochyta phaseolorum</i></u> , <u><i>Ascochyta boltshauseri</i></u>) Mosaico dorado Lorito verde (<u><i>Empoasca kraemeri</i></u>)

3.- Estudios Taxonómicos y de Cruzamiento

3.1.- Estudios taxonómicos

Estos estudios deben realizarse para definir los taxones al nivel del género, de la especie y de las divisiones infraespecíficas (subespecies, variedades), así mismo como para establecer las relaciones entre especies, especialmente en cuanto a P. vulgaris.

En su estado actual, el género Phaseolus consta de unas 30 a 35 especies todas de origen americano (Cuadro 3). Cuatro de estas especies incluyen formas cultivadas: P. vulgaris, P. lunatus (var. lunatus), P. coccineus (subsp. coccineus y subsp. polyanthus) y P. acutifolius (var. latifolius). Varias especies, previamente incluidas en Phaseolus, pertenecen ahora a los géneros Vigna o Macroptilium (Cuadro 4).

Varios estudios basados en caracteres morfológicos y bioquímicos han aclarado las relaciones entre especies del género. El cuadro 6 indica para algunas especies un coeficiente de similitud con P. vulgaris conseguido mediante taxonomía numérica por Maréchal et al. (1978).

Considerando las especies cultivadas, se puede concluir que P. coccineus es la especie más cercana a P. vulgaris, seguida por P. acutifolius y P. lunatus. Dentro de P. coccineus, la subespecie polyanthus muestra la mayor similitud con P. vulgaris. P. coccineus subsp. polyanthus (posibles sinónimos: P. dumosus, P.

Cuadro 3: Especies de Phaseolus

<i>Phaseolus acutifolius</i> A.Gray*	<i>P. nelsonii</i> Maréchal, Mascherpa & Stainier
<i>P. amblyosepalus</i> (Piper) Morton	<i>P. oaxacanus</i> Rose
<i>P. angustissimus</i> A. Gray	<i>P. pachyrrhizoides</i> Harms
<i>P. anisotrichus</i> Schlecht.	<i>P. parvulus</i> Greene
<i>P. augustii</i> Harms	<i>P. pedicellatus</i> Bentham
<i>P. brevicalyx</i> Micheli	<i>P. pluriflorus</i> Maréchal, Mascherpa & Stainier
<i>P. coccineus</i> L.*	<i>P. polymorphus</i> S. Watson
<i>P. filiformis</i> Bentham	<i>P. polystachyus</i> (L.) Britt., Sterns & Pogg
<i>P. galactoides</i> (Mart. & Galeotti) Maréchal, Mascherpa & Stainier	<i>P. ritensis</i> Jones
<i>P. glabellus</i> Piper	<i>P. sonorensis</i> Standley
<i>P. grayanus</i> Woot. & Standley	<i>P. tuerckheimii</i> Sonn. Smith
<i>P. lunatus</i> L.*	<i>P. vulgaris</i> L.*
<i>P. micranthus</i> Hooker & Arn.	<i>P. wrightii</i> A. Gray
<i>P. microcarpus</i> Mart.	<i>P. xanthotrichus</i> Piper

* Especies que contienen formas cultivadas.

Cuadro 4. Nueva clasificación de algunas especies de *Phaseolus* en los géneros *Vigna* y *Macroptilium* (según Maréchal et al., 1978).

Nombre antiguo	Nombre actual	Origen
<i>Phaseolus aureus</i> L.	<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek	Asia
<i>P. sublobatus</i> Roxb.	<i>V. radiata</i> var. <i>sublobata</i> (Roxb.) Verdcourt	Asia
<i>P. mungo</i> L.	<i>V. mungo</i> (L.) Hepper	India, Pakistan, Irán
<i>P. angularis</i> (Willd.) W.F. Wight	<i>V. angularis</i> (Willd.) Ohwi & Ohashi	Japón
<i>P. calcaratus</i> Roxb.	<i>V. umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & Ohashi	Extremo Oriente
<i>P. trilobatus</i> (L.) Schreber	<i>V. trilobata</i> (L.) Verdcourt	Asia del Sur
<i>P. aconitifolius</i> Jacq.	<i>V. aconitifolia</i> (Jacq.) Maréchal	India, Ceylán
<i>P. caracalla</i> L.	<i>V. caracalla</i> (L.) Verdcourt	Suramérica
<i>P. adenanthus</i> G.F. Meyer	<i>V. adenantha</i> (G.F. Meyer) Maréchal <u>et al.</u>	América Tropical
<i>P. lathyroides</i> L.	<i>Macroptilium lathyroides</i> (L.) Urban	Suramérica Tropical
<i>P. atropurpureus</i> DC.	<i>M. atropurpureum</i> (DC.) Urban	América Tropical

leucanthus, P. flavescens y P. coccineus subsp. darwinianus) crece en el Sur de México, Guatemala (500 - 1.700 m.) y en las regiones andinas de Venezuela, Colombia y Ecuador (1.500 - 2.500 m) (Piper, 1926; Hernández-Xolocotzi et al., 1959; Miranda-Colin, Bergland-Brucher y Brucher, 1974). Morfológicamente se trata de una forma generalmente intermedia entre P. vulgaris y P. coccineus subsp. coccineus. Tiene un hábito trepador con crecimiento muy profuso y grandes flores parecidas a las de coccineus^a. Su germinación es epígea (parecida a vulgaris) y el estigma es tanto externo (tipo coccineus) como interno (tipo vulgaris) en el estilo. El sistema radicular no es tuberoso como en coccineus, pero la base del tallo es altamente lignificada. Las bracteolas florales son distintas de las de vulgaris y coccineus, siendo mucho más largas que el cáliz y muy estrechas.

Ha sido sugerido por Hernández-Xolocotzi et al. (1959) que polyanthus ("darwinianus") resultaría de un cruce entre vulgaris y coccineus.

El examen de la morfología del polen también trae informaciones acerca de las relaciones entre especies en Phaseolus. Stainier (1974) encontró 4 tipos de polen formando una serie evolutiva desde el grupo P. lunatus - P. ritensis (más antiguo) al grupo P. vulgaris - P. coccineus (más reciente) (Fig. 1).

Los experimentos imuno-electroforéticos entre el antisuero contra las proteínas de semillas de P. vulgaris y los antígenos

^a A continuación se usarán los nombres coccineus y polyanthus sin la abreviación P. para referirse a las subespecies únicamente. Cuando se trata de la especie entera, se usará P. coccineus.

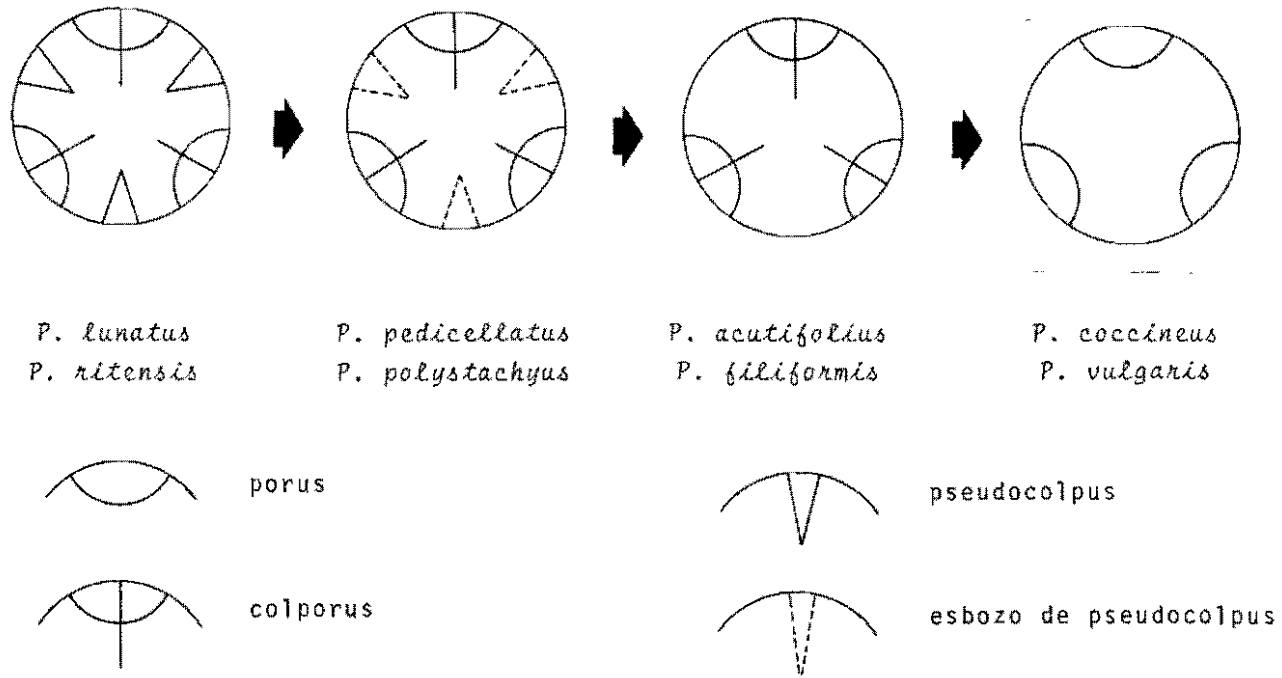


FIGURA 1: CARACTERISTICAS DEL POLEN DE ALGUNAS ESPECIES DE PHASEOLUS
(según Stainier, 1974)

constituídos por las proteínas de semillas de otras especies de Phaseolus indican que polyanthus y coccineus son claramente relacionados - aunque distintos - con P. vulgaris. P. acutifolius y más P. lunatus son muy alejados de P. vulgaris (Fig. 2), (Kloz, 1971).

En resumen, P. coccineus es la especie más relacionada a P. vulgaris y dentro de P. coccineus, la subespecie polyanthus puede ser considerada como la forma más cercana a P. vulgaris.

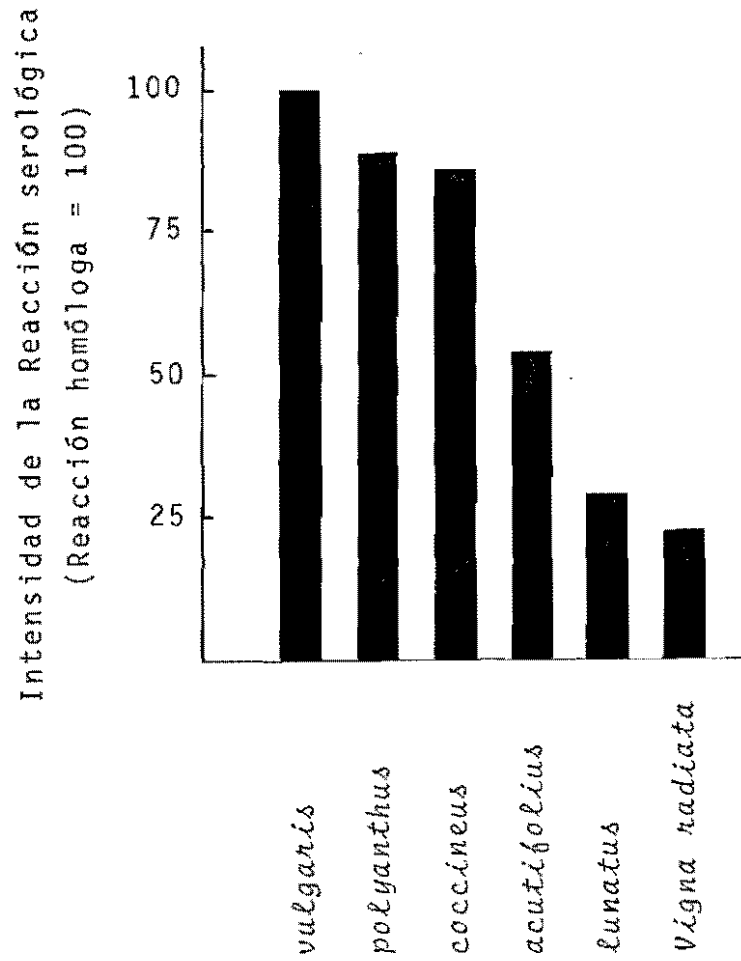
P. lunatus y hasta cierto punto P. acutifolius deben ser considerados como bastante distintos a P. vulgaris.

3.2.- Estudios de cruzamiento

El primer cruce interespecífico en Phaseolus fue hecho por Mendel (1866) entre P. nanus (= P. vulgaris) y P. multiflorus (= P. coccineus). Ya pudo observar algunas características de los cruces vulgaris x coccineus que serán discutidas más detalladamente en los párrafos siguientes: por ejemplo, la viabilidad y fertilidad reducida en la F₁ y la F₂ y la segregación importante en la F₂.

Después de Mendel, otros autores intentaron el mismo cruce así que otros cruces (Cuadro 5). Al-Yasiri y Coyne (1966) también intentaron -sin éxito- cruces intergenéricos entre las 4 especies cultivadas de Phaseolus y 3 especies asiáticas de Phaseolus (= Vigna) - P. mungo (= V. mungo), P. calcaratus (= V. umbellata) y P. angularis (= V. angularis).

FIGURA 2. RELACIONES SEROLOGICAS ENTRE LAS PROTEINAS DE LA SEMILLA DE *P. vulgaris* (ANTICUERPO) Y LAS DE OTRAS ESPECIES DE *Phaseolus* o *Vigna* (ANTIGENO) (según Kloz, 1971)



Quadro 5. Intentos exitosos de cruces interespecíficos en *Phaseolus*

Cruce	Referencia
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i>	Mendel (1866) y otros autores
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>polyanthus</i>	Buishand (1955), Le Marchand (1971)
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>formosus</i>	Le Marchand (1971)
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>obvallatus</i>	Maréchal & Baudouin (1980)
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> x <i>P. vulgaris</i>	Tschermak (1942), Lamprecht (1948), Al-Yasiri & Coyne (1966), Smartt (1970)
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>formosus</i> x <i>P. vulgaris</i>	Maréchal & Baudouin (1980)
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. acutifolius</i> y recíproco	Smartt (1970), Mok <u>et al.</u> (1978), Maréchal & Baudouin (1980)
<i>P. acutifolius</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i>	Coyne (1964), Maréchal & Baudouin (1980)
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. filiformis</i>	Maréchal & Baudouin (1978)
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. ritensis</i>	Braak & Kooistra (1975)
<i>P. lunatus</i> x <i>P. polystachyus</i>	Lorz (1952), Dhaliwal <u>et al.</u> (1962), Le Marchand <u>et al.</u> (1976)
<i>P. lunatus</i> x <i>P. ritensis</i>	Le Marchand <u>et al.</u> (1976)

El cuadro 6 enseña características de algunos cruces con P. vulgaris. Existe una buena correlación en el género Phaseolus entre a un lado la distancia taxonómica y al otro la facilidad del cruce y la fertilidad de la F₁.

A medida que aumenta la distancia taxonómica, aumenta también rápidamente el número de univalentes. En la misma forma, el porcentaje de granos de polen colorados por acetocarmín - una medida indirecta de la funcionalidad del polen - merma hasta niveles muy bajos.

Entre las especies probadas, P. coccineus es la especie que más fácil se cruza con P. vulgaris. Por lo tanto los esfuerzos en un proyecto de hibridaciones interespecíficas con P. vulgaris deben concentrarse en los cruces vulgaris x coccineus. Esta última especie comprende una variabilidad muy importante que podría ser de gran utilidad en el mejoramiento de P. vulgaris. El cuadro 7 indica algunas características potencialmente útiles, anotadas en la bibliografía o provenientes de observaciones personales. Se necesitan evaluaciones adicionales para conocer completamente las potencialidades tanto del coccineus, como también del polyanthus y las otras subespecies en relación con los caracteres mencionados en el cuadro 7 y otros como la resistencia al añublo bacteriano común, a la mancha de Ascochyta y el lorito verde (E. kraemeri), etc.

Cuadro 6. Características de algunos cruces interespecíficos con *P. vulgaris*.

Cruce	Coefficiente de similitud taxonómica	Uso de cultivo de embriones	Coloración del polen en la F ₁	Número de univalentes en la F ₁
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>polyanthus</i>	89%	—	30-35%	0,88
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i>	89%	—	10-30%; 31-34%	0; 0,32
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. coccineus</i> subsp. <i>formosus</i>	82%	—		1,64
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. acutifolius</i>	81%	—	10%	6
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. filiformis</i>	82%	—	0- 1%	6
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. ritensis</i>	74%	+		14
<i>P. vulgaris</i> x <i>P. lunatus</i>	66-69%	+	Viabilidad baja de híbridos supuestos	

Fuentes: Braak & Kooistra (1975), Maréchal (1971), Maréchal & Baudouin (1978 & 1980), Mok et al. (1978), Rabakoarihanta et al. (1980), observaciones personales.

Cuadro 7. Características de *P. coccineus* que puedan ser útiles para el
mejoramiento de *P. vulgaris*

-
- Arquitectura vegetal:
- 1) Sistema radicular fuerte (raíz tuberosa)
 - 2) Epicotilo largo (germinación hipógea)
 - 3) Inflorescencia: pedúnculo largo, alto número de inserciones florales.
 - 4) Mecanismo de polinización cruzada: estigma terminal, posición de las anteras en comparación con el estigma.
- Resistencia a:
- 1) Virus:
Mosaico común: Hubbeling (1957), Baggett & Frazier (1959).
Mosaico amarillo: Rudorf (1955), Hubbeling (1957), Baggett & Frazier (1959), Baggett et al. (1966).
 - 2) Bacterias:
Añublo de halo (*Pseudomonas phaseolicola*): Baggett and Frazier (1959).
Mancha parda (*Pseudomonas syringae*): Hagedorn & Rand (1973).
 - 3) Hongos:
Antracnosis (*Collectotrichum lindemuthianum*): Hubbeling (1957), Drijfhout (1979).
Pudriciones radiculares:
(*Pythium ultimum*): Dickson & Boettger (1977).
(*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*): Baggett & Frazier (1959).
Eslerotinirosis (*Sclerotinia sclerotiorum*): Adams et al. (1973).
 - 4) Insecto: Mosca del frijol (*Ophiomyia* sp.): Talekar (1979).
-

4.- Establecimiento y evaluación de colecciones de germoplasma de las especies silvestres.

Es necesario disponer de amplias colecciones de germoplasma de las especies silvestres. La variabilidad dentro de estas especies puede ser muy importante y por lo tanto se tiene que evaluar un gran número de introducciones con el fin de estimar las potencialidades de cada especie.

Se pueden formar colecciones directamente, mediante recolecciones en el campo o indirectamente, mediante las colecciones de otros bancos de germoplasma. Puesto que el número de introducciones de especies silvestres en los bancos de germoplasma es generalmente bajo y que el peligro de erosión genética es cada vez más notorio, una parte de las actividades de recolección en el campo debe ser dedicada a las especies silvestres.

Puesto que ninguna especie puede ser considerada como completamente homogénea para una característica dada, es preciso evaluar el número más alto posible de introducciones de cada especie silvestre. Las evaluaciones deben realizarse bajo una presión de selección alta y con varias repeticiones en el tiempo y en el espacio, para seleccionar las mejores introducciones.

También es necesario realizar evaluaciones completas, es decir, no solamente para aquellas características buscadas, sino igualmente para otras características importantes, para de esta manera eliminar aquellas accesiones donde los caracteres positivos están asociados con caracteres negativos, como susceptibilidades altas.

Como ejemplo, se dan algunos resultados de una evaluación

del germoplasma de P. acutifolius (Cuadro 8).

5.- Cruzamiento

5.1.- Tasa de éxito y sus factores

La tasa de éxito de cruzamientos interespecíficos generalmente es baja, comparándola con los cruzamientos intraespecíficos. El cuadro 9 da una comparación de las tasas de éxitos - expresadas como porcentaje de semillas o vainas por polinización - en cruces vulgaris x coccineus y dentro de vulgaris. El grado de reducción de la tasa de éxito varía según la fuente y esto puede ser atribuido principalmente a diferencias en los progenitores, a su adaptación y a las condiciones ambientales específicas durante las operaciones de cruzamiento.

Varios factores influyen en la tasa de éxito. Cuanto más distante la relación entre especies, tanto más baja la tasa de éxito. Se han observado también diferencias recíprocas, como por ejemplo en los cruces entre vulgaris y coccineus. Lamprecht (1948) registró una tasa de éxito de 1,2 semillas por polinización en los cruces con vulgaris como madre contra 0,004 semillas por polinización con coccineus como madre.

La tasa de éxito varía también según la combinación de progenitores, tanto la madre que el padre (véase como ejemplos los cuadros 10 y 11 para los cruzamientos vulgaris x coccineus).

5.2.- Cultivo de embriones

Los resultados mencionados en el párrafo 5.1. fueron

Cuadro 8. Calificación visual de daños por *Empoasca kraemeri* en algunas introducciones de *Phaseolus acutifolius*.

(en colaboración con el programa de Entomología de Frijol)

Introducción	Calificación ¹	Introducción	Calificación	Introducción	Calificación
G 40035	1,5	G 40050	2,7	G 40001	3,6
36	"	05	2,8	07	"
19	1,7	09	"	52	"
20	2,1	44	"	12	3,8
15	2,2	46	"	25	"
03	2,5	53	2,9	30	"
04	"	54	"	33	"
09	"	55	"	16	0,4
11	"	43	3,0	41	"
34	"	14	"	37	4,1
31	2,6	51	"	08	4,2
02	2,7	39	3,1	38	4,4
13	"	49	"	24	4,5
17	"	18	3,2		
32	"	45	3,3		
57	"	47	3,4		

¹ Escala de calificación 1: Resistente - 5: Susceptible

Cuadro 9. Comparación de la tasa de éxito en los cruzamientos interespecíficos *vulgaris* x *coccineus* e intraespecíficos *vulgaris*

Fuente	Intraespecíficos <i>vulgaris</i>		Interespecíficos <i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>	
	Semillas/ polinización	Vainas/ polinización	Semillas/ polinización	Vainas/ polinización
Lamprecht (1948)	165*		120	
Rudorf (1961)	194	71	28	9
Al-Yasiri & Coyne (1966)		46		37
Maréchal & Baudouin (1980)		29		8

* Datos expresados en %

Cuadro 10. Influencia de la combinación de progenitores sobre la tasa de éxito de los cruzamientos *vulgaris* x *coccineus*.
I. Efecto del padre *vulgaris* (según Maréchal & Baudouin, 1980).

Padre <i>vulgaris</i> (♀)	Padre <i>coccineus</i> (♂)	
	P.I. 165.421	P.I. 201.297
Nep 2	7,0 ^a	
P.I. 281.974		0,0
100/3 (Pop x Nep 2)	2,6	5,7
X28-3-66 café	12,8	4,6
X28-3-66 crema	2,0	0,0
60/5 (Pop x Nep 2)	7,0	
50609 N-283	6,9	
Junín 25	5,6	
Nain complet	7,0	
P.I. 181.892		7,5
Brazil 2	11,8	6,4
Puebla 87		22,7
Promedio	6,4	7,3

^a Tasa de éxito expresada como número de vainas/polinización (%)

Cuadro 11. Influencia de la combinación de progenitores sobre la tasa de éxito de los cruzamientos *vulgaris* x *coccineus*. II. Efecto del padre *coccineus* (según Maréchal & Baudouin, 1980).

Padre vulgaris (♀)	Padre coccineus (♂)	Vainas/polinización (%)
100/3 (Pop x Nep 2)	Hammond's Dwarf	6,7
	P.I. 165.421	2,6
	P.I. 201.297	5,7
X28-3-66 café	P.I. 165.421	12,8
	P.I. 201.297	4,6
X28-3-66 crema	P.I. 165.421	2,0
	P.I. 201.297	0,0
Brazil 2	P.I. 165.421	11,8
	P.I. 201.297	6,4

conseguidos usando el método tradicional de cruzamiento, descrito por Buishand (1954). En algunos casos (por ej. coccineus x vulgaris , vulgaris x acutifolius y recíproco) las tasas de éxito con este método pueden ser bastante bajas y algunos autores han usado técnicas adicionales para conseguir semillas F₁.

La técnica más frecuente es el cultivo de embriones. Cuando las vainas empiezan a mostrar señas de aborto (por ej. amarillamiento, flaccidez) se quitan en forma aséptica los embriones de las semillas en desarrollo y se colocan en un medio nutritivo. Cuando las plántulas alcanzan un tamaño suficiente, se transfieren a un substrato, como arena, vermiculita, etc. El cuadro 12 presenta una breve relación de los experimentos con cultivos de embriones en los cruces interespecíficos en Phaseolus. Uno de los factores más importantes para el éxito del cultivo de embriones es el tamaño del embrión al momento del transplante al medio de cultivo: cuánto más grande el tamaño, tanto más elevada la tasa de éxito. En los cruces lunatus x vulgaris, el aborto ocurre tan temprano que los embriones no tienen un desarrollo suficiente para crecer en un medio nutritivo (Mok et al., 1978). En otros cruces (por ej. vulgaris x acutifolius y recíproco, vulgaris x ritensis, coccineus x vulgaris) el aborto puede ocurrir más tarde - generalmente hasta 2 a 3 semanas después de la polinización, y en esa etapa los embriones son más grandes y pueden crecer en un medio nutritivo (Mok et al., 1978, Braak & Kooistra, 1975, Kroh, 1962).

El tamaño de los embriones es influenciado por las especies

Cuadro 12: Experimentos de cultivo de embriones en Phaseolus

Fuente	Material vegetativo		Método de cultivo
	Tipo	Edad del embrión	
Honma (1955)	<u>vulgaris</u> x <u>acutifolius</u>	14-24 días	a) Medio líquido: White + 5% sucrosa b) Antes de trasplantar, reducción escalonada del nivel de sucrosa.
Kroh (1962)	<u>vulgaris</u> x <u>coccineus</u>	hasta 21 días	a) Tomaszewski + agar 0,75% + sacarosa 3%. b) Embriones de más de 10 días. c) Para mejorar enraicamiento, transferencia a medio líquido antes del trasplante.
Braak y Kooistra (1975)	<u>vulgaris</u> <u>vulgaris</u> x <u>ritensis</u>	variable	a) No hay diferencias entre Tomaszewski y White. b) Embriones pequeños (< 0,7 mm): medio mineral, sucrose 4% + hidrolisado de caseína 0,5%.
Mok <u>et al.</u> (1978)	<u>vulgaris</u> x <u>lunatus</u> <u>vulgaris</u> x <u>acutifolius</u>	variable	a) Murashige - Skoog + sucrosa 3%, myo-inositol, thiamina, vitamina B ₂ , piridoxina, agar 0,8%; pH = 5,7. b) Efecto benéfico de glutamina

evaluadas en el cruce, la dirección del cruce y la combinación de progenitores (Cuadro 13) (Mok et al., 1978).

Una segunda dificultad en el cultivo de embriones es el trasplante del medio de cultivo al sustrato. Las plántulas cultivadas en un medio de cultivo tienen un sistema radicular poco desarrollado. Para promover el enraizamiento, el contenido de sucrose puede ser rebajado gradualmente del 4% usual al 0%, o se puede cultivar las plantulas en un medio nutritivo líquido, antes de transferirlas al sustrato.

Usando el cultivo de embriones ha sido posible obtener plantas con buena viabilidad y que llegan a floración. Hay que darse cuenta sin embargo, que esta técnica es bastante complicada y requiere un equipo especializado (por ej. cámara de flujo laminar, autoclave, etc.). El cultivo de embriones sólo debe usarse por lo tanto cuando técnicas más sencillas, como la extensión del rango de padres, han fracasado.

Otros medios han sido usados para aliviar los problemas del cruce inicial. Al-Yasiri y Coyne (1964) mencionan que la aplicación de acetamida de naftalina al pedicelo de flores polinizadas aumentó la formación y el crecimiento de las vainas y retardó el aborto en los cruces vulgaris x acutifolius. Ibrahim (1974) aumentó la formación de vainas y retardó el aborto en cruces coccineus x vulgaris aplicando la solución nutritiva de White o una solución de 4% de sucrose en el estigma inmediatamente antes de la polinización. Ibrahim y Coyne (1975) mencionan que

Cuadro 13: Influencia de la especie, del sentido del cruce y del genotipo de los padres sobre el crecimiento del embrión.
(Según Mok et al., 1978).

Cruce	Tamaño del embrión (mm) ^a
<u>P. vulgaris</u> x <u>P. acutifolius</u>	
Great Northern x P.I. 310.800	3,2 \pm 0,3
Great Northern x P.I. 321.637	3,0 \pm 0,4
Gallatin 50 x P.I. 310.800	3,6 \pm 0,3
Gallatin 50 x P.I. 321.637	2,8 \pm 0,3
<u>P. acutifolius</u> x <u>P. vulgaris</u>	
P.I. 321.637 x Great Northern	2,0 \pm 0,1
P.I. 321.637 x Gallatin 50	2,5 \pm 0,4
<u>P. vulgaris</u> x <u>P. lunatus</u>	
Great Northern x Kingston	0,34 \pm 0,08
Great Northern x Burpee Hybrid	0,15 \pm 0,03
Gallatin 50 x Kingston	0,40 \pm 0,02
Gallatin 50 x Burpee Hybrid	0,27 \pm 0,04

^a 21 días después de la polinización.

podieron conseguir semillas maduras en cruces coccineus x vulgaris, separando las vainas a las primeras señas de aborto y manteniéndolas en un ambiente fresco y húmedo, ó también rompiendo parcialmente el pedicelo de la vaina.

5.3.- Posibles causas de la falta de éxito en el cruce inicial.

Tal como Smartt (1971) hizo notar, los cruces interespecíficos pueden fallar por cualquiera de las siguientes razones:

- a) El polen no germina en el estigma.
- b) El polen no penetra en el estilo
- c) El polen no efectúa la fecundación
- d) El cigoto no se desarrolla o el embrión aborta
- e) La semilla madura no germina.

Los datos relacionados con los puntos a) y b) son algo contradictorios. Hawkins y Evans (1973) en su estudio de los cruces vulgaris x coccineus y recíprocos, observaron que los tubos polínicos tenían un crecimiento normal y penetraban los óvulos en ambos cruces. Concluyeron que la falta de éxito en los cruces posiblemente se debería a factores actuando al momento de la fertilización o después. Ibrahim (1974) encontró que la aplicación de la solución mineral de White o de una solución de 4% de sucrosa al estigma al momento de la polinización aumentaba la formación de vainas en los cruces coccineus x vulgaris y concluyó que la baja tasa de éxito en este cruce podría ser atribuída en parte a causas nutricionales provocando una reducción en la germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos.

Rabakoarihanta et al. (1979) no encontraron ninguna diferencia en el número y el largo de los tubos polínicos en los cruces vulgaris x acutifolius (y recíprocos), en comparación con cruces intraespecíficos; además, no se observó ningún aumento en la duración entre la polinización y la fertilización, indicando que en estos cruces los eventos pre-fertilización son aparentemente normales.

Las secuencias post-fertilización especialmente en cuanto a d), han sido estudiadas por varios autores. Thomas (1964) siguió el desarrollo del embrión y endospermo en cruces intraespecíficos vulgaris o coccineus e interespecíficos vulgaris x coccineus (y recíprocos) contando el número de núcleos cada 48h. Los embriones y endospermos híbridos mostraron un desarrollo retardado en comparación con los embriones y endospermos que resultaban de autopolinización. Esta reducción del desarrollo fue muy notoria en los cruces coccineus x vulgaris y tiene que estar correlacionada con las diferencias recíprocas en las tasas de éxito de estos cruces.

Kroh (1962) también observó un desarrollo reducido del embrión en los cruces coccineus x vulgaris. Además observó anomalías en la diferenciación, especialmente en cuanto a los cotiledones, y una proliferación del endospermo empezando 10 a 14 días después de la polinización. Según Kroh, la hibridación perturbaría correlaciones de origen nutricional - fisiológico, establecidas entre el embrión, el endospermo y los tejidos maternos.

Mok et al. (1978) (en cruces vulgaris x acutifolius y recíprocos) y Braak y Kooistra (1975) (en cruces vulgaris x ritensis) igualmente observaron un desarrollo reducido del embrión y anormalidad es en los cotiledones.

En los últimos años, cromosomas polítenos fueron descubiertos en las células del suspensor de embriones de Phaseolus (Nagel, 1969). La presencia de este tipo de cromosomas indicaría un alto nivel de actividad metabólica en estas células y ha sido propuesto que el suspensor podría tener un papel fundamental en el desarrollo del embrión.

Haq et al. (1973) observaron mediante reacciones histoquímicas que la baja tasa del crecimiento del embrión y del endospermo en cruces coccineus x vulgaris parecía estar correlacionada por un bajo nivel de actividad metabólica del suspensor.

Cionini et al (1976) mostraron que la eliminación del suspensor de embriones jóvenes de coccineus reducía el desarrollo del embrión. El ácido giberélico (AG₃) en concentraciones de 10⁻⁸ a 10⁻⁶ M pudo reemplazar el suspensor de embriones en las etapas "forma de corazón" y "cotiledonaria temprana".

Ibrahim (1974) obtuvo semillas coccineus x vulgaris maduras poniendo vainas en vía de aborto en un ambiente húmedo y fresco ó rompiendo parcialmente los pedicelos, lo que indicaría algún efecto adverso del progenitor coccineus.

La escasa evidencia obtenida hasta ahora no permite obtener

conclusiones definitivas sobre las razones básicas del aborto en los cruces de Phaseolus. Parecería que se podría excluir los eventos prefertilización y de fertilización. En cuanto a los eventos post-fertilización, dos aspectos principales deben considerarse: el genotipo híbrido, y las relaciones embrión-endospermo-tejidos maternos. Puesto que el genotipo híbrido resulta de un cruce entre genotipos muy distintos, varios tipos de desequilibrios pueden impedir la formación de semillas maduras. El desequilibrio genotípico en esta etapa no sería básicamente diferente del que produce una viabilidad reducida en la F₁.

Las relaciones entre embrión, cotiledones, endospermo y tejidos maternos podría ser afectada, entre varias posibilidades, por perturbaciones en la transferencia de nutrimentos de los tejidos maternos al embrión y los cotiledones ó por la producción de inhibidores por el progenitor femenino.

6.- Viabilidad y fertilidad de las progenes

6.1.- Viabilidad

En la F₁ de los cruces vulgaris x coccineus, se pueden observar principalmente tres tipos de plantas: enanas letales, enanas deformes y plantas normales.

Las plantas enanas letales (también llamadas enanas tipo B por Kedar y Bemis (1960)), germinan más rápidamente que plantas vulgaris o híbridos vulgaris x coccineus normales. Los co-

tilledones no se secan y tampoco se caen. Las hojas primarias no alcanzan el tamaño observado en plantas vulgaris o híbridos vulgaris x coccineus normales. A veces se forman una o dos hojas trifoliadas. Estas plántulas generalmente mueren 5 a 6 semanas después de la siembra.

Las plantas enanas letales han sido observadas por varios autores: Lamprecht (1941, 1948: "hohen Zwerge" o "sterilen Zwerge"), Kedar y Bemis (1960: "T-dwarf"), Rudorf (1961: Kruppel-typ y Ibrahim y Coyne (1973). Este tipo de planta tiene entrenudos cortos y foliolos pequeños. Las hojas son arrugadas y tienen un color verde oscuro con una tinta oscura debido a la presencia de pequeños puntos necróticos.

Al principio de la floración, aparecen pequeñas yemas florales que generalmente caen temprano. Después aparecen flores completas, generalmente anormales (pigmentación reducida, quilla deformada, etc.). Las enanas deformadas son extremadamente estériles, aunque no completamente y pueden vivir por más de un año. Según Kroh (1962) los cruces recíprocos tienen el mismo fenotipo, indicando que este tipo de planta se encuentra bajo un control genético nuclear. Según la combinación de progenitores, la F_1 es homogénea y comprende tipos normales o tipos enanos deformados; o la F_1 es heterogénea y comprende tipos normales y deformados en las proporciones 1:1, 3:1, o 1:3 (Lamprecht, 1948; Rudorf, 1961). Estas segregaciones se deben a la heterocigotía del padre coccineus. A pesar de que la alta esterilidad

impide un conocimiento preciso acerca de la herencia de este tipo de planta, dos hipótesis han sido propuestas. Según Rudorf (1961), dos genes complementarios están involucrados, detectus (revelado) y debilis (débil). El gen det siempre es homocigoto dominante en vulgaris y homocigoto recesivo en coccineus; el gen deb es homocigoto recesivo en vulgaris y homocigoto - dominante o recesivo - en coccineus. El fenotipo anormal aparece cuando los dos genes det y deb están presentes en el estado dominante en el mismo genotipo.

Según Bemis y Kedar (1961) la aparición de este tipo anormal depende de un gen con tres alelos T^V , T^C y T^{VC} . T^V es incompatible con T^C y en conjunto producen enanos deformados ("T-dwarfs"). T^{VC} es compatible con T^V o T^C .

Dentro de los tipos normales, puede existir una variación considerable en el crecimiento, desde plantas con un desarrollo reducido y una ausencia de flores, hasta plantas con un crecimiento profuso, una ramificación intensa, y un alto número de flores, parecidas a coccineus.

Existe una diferencia muy marcada entre las progenies de los cruces vulgaris x coccineus y vulgaris x polyanthus. En estos últimos, ningún tipo anormal-plantas enanas letales y deformadas-han sido observadas hasta ahora; todas las plantas F_1 tienen un buen crecimiento, comparable al padre polyanthus (Cuadro 14).

En la F_2 , se pueden observar numerosos tipos de crecimiento,

Cuadro 14: Distribución de tipos enanos letales y deformados en la F₁ de cruces *vulgaris* x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus*

	Norma- les	Enanos letales	Enanos defor- mados	Normales y deformados (progenies mixtas)	Total cru- ces
<i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>	72	5	22	10	109
<i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i>	16				16

desde semillas que no germinan a plantas con un buen desarrollo y una buena floración. La frecuencia de esta última categoría es generalmente más alta en los cruces vulgaris x coccineus (Cuadro 15).

Un tipo anormal de planta que aparece en la F₂ y las generaciones ulteriores de los cruces entre vulgaris y las 4 subespecies de P. coccineus es el tipo angustifolius (Lamprecht, 1941). Los folíolos estrechos, alargados y arrugados son la característica principal de este tipo. Existe una variación en cuanto al hábito de crecimiento (arbustivo o trepador), la estrechura, la rugosidad, y el color (verde claro o oscuro) de los folíolos. A veces una mutación de yema puede producir una ramificación angustifolius en una planta normal. La gran mayoría de las plantas angustifolius son completamente estériles. Sin embargo, algunas pueden producir unas semillas, especialmente esas con folíolos menos estrechos y arrugados. La mayoría de las plantas en las progenies de plantas angustifolius tienen hojas normales.

En la F₃ y las generaciones ulteriores de los cruces P. vulgaris x P. coccineus una segregación muy amplia para la viabilidad aparece otra vez. Aún en las progenies de plantas F₂ con buen crecimiento se puede encontrar todavía plantas con viabilidad muy baja.

Se tiene pocos datos sobre los cruces coccineus x vulgaris, debido al éxito muy bajo del cruzamiento. Lamprecht (1948) con-

Cuadro 15. Viabilidad y fertilidad en la F₂ de cruces *vulgaris* x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus*

Cruce			Semillas sembradas	Semillas germinadas	Plantas sin florecer	Plantas en floración, estériles	Plantas fértiles	
1. <i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>								
Nep 2	x	NI 132	52	34	14	10	10 (19,2%)	
NI 161	x	NI 191	11	6	2	1	3 (27,3%)	
NI 161	x	NI 2	29	23	6	8	9 (31,0%)	
NI 161	x	NI 229	76	68	23	28	27 (35,5%)	
ICA-Palmar	x	NI 2	13	9	1	2	6 (42,2%)	
P.I.310.805	x	Puebla 56-C	29	25	4	5	16 (55,2%)	
Promedio			230 ^a		71,7% ^b	21,7%	23,5%	30,9%
2. <i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i>								
NI 161	x	P.I.201.304	56	39	4	3	32 (57,1%)	
P.I.165.078	x	NI 490	88	64	4	5	55 (62,5%)	
ICA-Pijao	x	NI 490	67	51	5	4	42 (62,7%)	
G2047	x	P.I.201.304	328	279	24	29	226 (68,9%)	
Promedio			539		80,3%	6,9%	7,6%	65,9%

^a Número total de semillas sembradas

^b Promedios en porciento del número total de semillas sembradas.

siguió algunas semillas F_1 que no germinaron. Después de numerosos intentos, Smartt (1970) consiguió una combinación de progenitores exitosa que dió una F_1 con una buena viabilidad (y fertilidad). Es posible atribuir las diferencias en los resultados de Smartt y Lamprecht a los progenitores usados en el cruzamiento.

En los cruces entre vulgaris y acutifolius, Smartt (1970) obtuvo híbridos en floración (pero estériles). Se observaron también diferencias recíprocas. Cuando vulgaris era el padre femenino, los híbridos persistieron de 6 hasta 9 meses; con acutifolius como padre femenino, los híbridos murieron después de 6 a 8 semanas.

Plantas F_1 en floración (pero estériles) fueron conseguidas por Maréchal y Baudouin (1978) en cruces vulgaris x filiiformis y por Braak y Kooistra (1975) en cruces vulgaris x ritensis.

6.2.- Fertilidad

Las generaciones tempranas de cruces interespecíficos también se caracterizan por una fertilidad reducida.

El cuadro 16 muestra el número promedio de semillas por planta y por vaina producidas por autopolinización natural en plantas F_1 en cruces entre vulgaris como padre femenino y coccineus o polyanthus como padre masculino. La progenies F_1 de

Cuadro 16. Fertilidad en la F₁ de cruces *vulgaris* x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus*.

Cruces	Semillas/ planta ^a	Semillas/vaina (número de vainas)
1. <i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>		
NI 161 x NI 191	0	0
ICA-Palmar x NI 2	2	1,2 (31)
NI 161 x NI 229	3	1,1 (283)
Nep 2 x NI 132	5	1,4 (60)
NI 141 x NI 229	9	1,2 (77)
P. I. 310.805 x Puebla 56-C	12	1,3 (38)
Promedio	5	1,2 (489)
2. <i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i>		
P. I. 165.078 x P. I. 201.342	19	1,2 (75)
NI 161 x P. I. 201.304	23	1,2 (30)
P. I. 165.078 x NI 490	29	1,2 (80)
ICA-Pijao x NI 490	53	1,1 (56)
G2047 x NI 490	72	1,7 (119)
G2047 x NI 373	97	2,1 (221)
G2047 x P. I. 201.304	120	2,0 (300)
Promedio	65	1,8 (881)

^a Por autopolinización natural.

los cruces vulgaris x polyanthus son en promedio más fértiles que las progenies F₁ vulgaris x coccineus. Además, dentro de cada clase existe una variación según la combinación de progenitores.

Autopolinizaciones manuales aumentan la producción de semillas, especialmente en las F₁ vulgaris x coccineus. Sin embargo, el éxito de estas autopolinizaciones es generalmente bajo (Cuadro 17).

En la F₂ hay una variación muy amplia para la fertilidad. En cada población, una parte de las plantas no produce semillas, o porque las plantas no llegan a la floración o porque las flores son estériles. La proporción de estas plantas estériles es más alta en los cruces vulgaris x coccineus que en los cruces vulgaris x polyanthus (véase también el Cuadro 16). Dentro de las plantas que producen semillas, el número de semillas por planta puede variar mucho: por ej.: en el cruce G 2047 x P.I. 201.304: de 0 a 821 semillas por planta; en el cruce P.I. 310.805 x Puebla 56-C: de 0 a 387 semillas por planta (Figura 3).

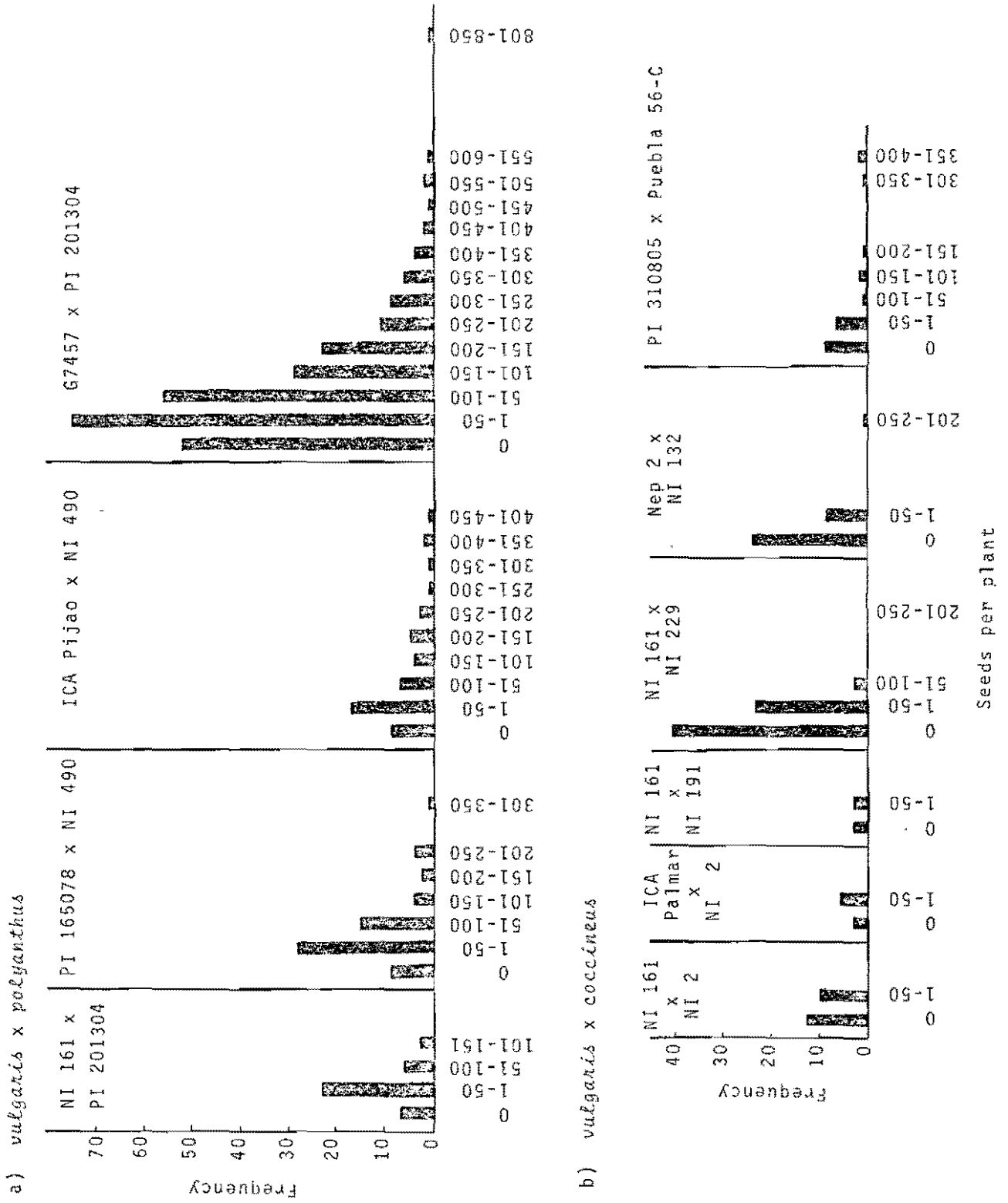
En promedio los cruces con polyanthus tienen un número más alto de semillas por planta o por vaina (Cuadro 18). Dentro de cada clase de cruce, existen diferencias según la combinación de padres como ya se había observado en la F₁ (Cuadro 19). Además, existe cierta correlación entre la fertilidad en la F₁ y en la F₂ (compárese los cuadros 16 y 19).

Cuadro 17. Aumento de la producción de semillas por intermedio de autopolinizaciones manuales en la F₁ de cruces *vulgaris* x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus*.

Cruces	Semillas por planta			Tasa de éxito autopolinizaciones manuales (%)
	Auto-polinización natural	Auto-polinización manual	Total	
1. <i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>				
NI 161 x NI 191	0	3	3	5 (5/92) ^a
ICA-Palmar x NI 2	2	12	14	9 (20/229)
NI 161 x NI 229	3	27	30	12 (148/1247)
Nep 2 x NI 132	5	28	33	26 (33/125)
NI 141 x NI 229	9	18	27	13 (59/456)
P.I.310.805 x Puebla 56-C	12	4	16	23 (14/60)
Promedio	5	18	23	13 (279/2209)
2. <i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i>				
P.I.165.078 x P.I.201.342	19	10	29	15 (20/130)
NI 161 x P.I.201.304	23	8	31	14 (9/62)
P.I.165.078 x NI 490	29	21	50	17 (34/201)
ICA-Pijao x NI 490	53	32	85	14 (54/371)
G2047 x NI 490	72	29	101	26 (30/115)
G2047 x NI 373	97	56	153	27 (62/232)
G2047 x P.I.201.304	120	16	136	38 (42/111)
Promedio	65	26	91	20 (251/1222)

^a (número de vainas/número de intentos)

FIGURE 3: DISTRIBUTION OF SEEDS PER PLANT IN THE F₂ OF *P. VULGARIS* X *P. COCCINEUS* CROSSES



Cuadro 18. Fertilidad en la F₂ de cruces

vulgaris x coccineus y vulgaris x polyanthus

Cruce	Semillas/ planta ¹	Semillas/ vaina
<i>vulgaris x coccineus</i>	18,0 a ²	0,7 a
<i>vulgaris x polyanthus</i>	84,1 b	1,5 b

¹ Los datos presentados son promedios de 6 cruces *vulgaris x coccineus* y cuatro cruces *vulgaris x polyanthus*.

² Dentro de cada columna, los datos seguidos por la misma letra no son distintos al nivel 0,05 según el test de Duncan.

Quadro 19. Fertilidad de progenies F₂ de algunos cruces *vulgaris*
x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus*.

Cruce	Semillas/planta	Semillas/vaina
1. <i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>		
NI 161 x NI 2	2,4 a ¹	0,6 a
ICA-Palmar x NI 2	2,6 a	0,9 ab
NI 161 x NI 191	3,8 a	0,7 ab
NI 161 x NI 229	8,7 a	0,5 a
Nep 2 x NI 132	10,9 a	0,6 a
PI.310.805 x Puebla 56 C	75,9 b	1,4 bc
2. <i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i>		
NI 161 x PI.201.304	32,1 ab	1,1 b
PI.165.078 x NI 490	58,5 b	1,3 b
G 7457 x PI.201.304	94,2 c	1,6 c
ICA-Pijao x NI 490	101,3 c	1,5 bc

¹ Dentro de cada columna, los datos seguidos por la misma letra no son diferentes al nivel 0,05 según el test de Duncan.

La viabilidad y la fertilidad más alta de los cruces vulgaris x polyanthus en comparación con los cruces vulgaris x coccineus pueden ser atribuidas a una mejor compatibilidad entre los padres, correlacionada con una relación taxonómica más estrecha.

6.3.- Uso de retrocruces para restaurar la fertilidad.

Cuando la F_1 es altamente estéril, se puede usar retrocruzamientos para asegurar una progenie. Smartt retrocruzó un híbrido F_1 vulgaris x coccineus con ambos padres. Los cruces recíprocos hacia el padre vulgaris fueron los más exitosos, el cruce coccineus x F_1 fue intermedio y el cruce F_1 x coccineus fue el menos exitoso (Cuadro 20). Las progenies de retrocruzamientos hacia el padre vulgaris son en promedio más fértiles que la F_2 resultando de autopolinización (Cuadro 21). Pueden existir sin embargo, diferencias recíprocas como lo anotaron Wall (1968) y Smartt (1970). Las progenies de retrocruces parecen ser más fértiles cuando se usa la F_1 como macho y el vulgaris o coccineus como hembra. Empero en los cruces interespecíficos no solo en Phaseolus, sino también en otros géneros, se usa generalmente la F_1 como hembra ya que la baja cantidad de polen en las flores de estas plantas impide su uso efectivo como machos. Además, en los cruces vulgaris x coccineus, se presenta una eliminación selectiva de caracteres de coccineus a través de los gametos machos, como se discutirá más en detalles en el parágrafo 7.4.

Cuadro 20. Tasas de éxito de retrocruzamientos recíprocos de la F₁ a los padres *vulgaris* y *coccineus* (según Smartt, 1970).

Retrocruzamiento	Semillas por polinización (%)
F ₁ x <i>vulgaris</i>	46,6
F ₁ x <i>coccineus</i>	2,4
<i>vulgaris</i> x F ₁	54,6
<i>coccineus</i> x F ₁	19,6

Cuadro 21. Efecto del retrocruzamiento sobre la fertilidad en cruces
vulgaris x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus*.

Cruce	Semillas/ planta	Semillas/ vaina
<i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i> : NI 161 x NI 2		
F ₁	32,8	1,4
F ₂	2,4	0,6
F ₁ x NI 161	65,0	2,1
<i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i> : ICA-Pijao x NI 490		
F ₂	101,3	1,5
F ₁ x ICA-Pijao	279,7	3,3

6.4.- Producción de tetraploides para restaurar la fertilidad.

En ciertos casos, la fertilidad puede restaurarse duplicando el número de cromosomas de la F_1 , usando colchicina. A consecuencia de esta operación se consigue un genomio tetraploide que consta de pares de cromosomas completamente homólogos. Se elimina así la falta de apareamiento causada por la heterocigotía estructural.

Smartt y Haq (1972) estudiaron la fertilidad de híbridos F_1 vulgaris x coccineus duplicados por colchicina y de sus progenies. La fertilidad fué estimada por el porcentaje de colocación del polen al acetocarmín. La F_1 duplicada mostró una fertilidad superior a la de la F_1 sin duplicar, empero sin alcanzar el nivel de fertilidad de los padres. La progenie de la F_1 duplicada produjo una segregación con aumentos y reducciones de la fertilidad. En la generación C_5 , la fertilidad fué todavía inferior a la de los padres (Cuadro 22). Los intentos para cruzar la F_1 duplicada con ambos padres en forma recíproca fallaron.

La duplicación del número de cromosomas por colchicina también fue usada por Braak y Kooistra (1975) para conseguir una progenie de su híbrido F_1 vulgaris x ritensis completamente estéril y por Dhaliwal et al. (1962) en el cruce lunatus x polystachyus.

Cuadro 22. Fertilidad de los padres, de las F₁ y F₂ y de las generaciones duplicadas por colchicina en un cruce *vulgaris* x *coccineus* (según Smartt & Haq, 1972).

	Coloración del polen (%) ¹	
	Promedio	Rango
<i>P. vulgaris</i> cv. Masterpiece	94,2	85,0 - 95,0
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> cv. Hammond's Dwarf	86,5	78,5 - 93,5
F ₁	21,0	8,0 - 37,5
F ₂	62,0	44,2 - 86,0
F ₁ duplicada por colchicina	42,2	30,7 - 48,9
C ₁	49,7	45,1 - 56,4
C ₂	47,6	31,6 - 61,9
C ₃	36,3	3,6 - 64,4
C ₄	64,7	55,3 - 74,7
C ₅	67,7	50,8 - 76,7

¹ Proporción de los granos de polen coloreados por acetocarmín.

7.- Características morfológicas y segregación en las progenies.

7.1.- Generación F₁

En los cruces vulgaris x coccineus, las combinaciones compatibles de padres producen plantas F₁ de tipo arbustivo o trepador con un crecimiento muy profuso. Además, estas plantas tienen un ciclo muy largo que puede extenderse hasta 9 a 12 meses. Tanto el crecimiento como la longevidad del ciclo de vida son características de coccineus que son parcialmente transmitidas a la F₁. También la expresión de esas 2 características puede ser aumentada por la esterilidad de la F₁, lo que a su vez compensa la baja fertilidad.

Muchos de los caracteres de la F₁ en los cruces vulgaris x coccineus son intermedios entre los 2 padres. Los híbridos tienen una germinación intermedia con los cotiledones a penas encima del nivel del suelo (vulgaris: germinación epigea; coccineus: hipógea).

El largo del pedúnculo y el número de inserciones florales del racimo generalmente son más grandes que en vulgaris, sin alcanzar los niveles de coccineus.

El tamaño de las flores y la posición de las flores son intermedias entre vulgaris y coccineus. Cruces con líneas de coccineus con flores escarlatas dan plantas F₁ con flores rojas. Este color rojo es distinto del color escarlato de coccineus y puede variar según el color de la flor del progenitor vulgaris. En algunos casos, cruces con un coccineus de

flor blanca puede dar una F_1 con flores rojas.

El estigma híbrido está situado en la parte terminal del estilo, extendiéndose en sus lados externos e internos, aunque más en el último.

El tamaño de las semillas es intermedio entre vulgaris y coccineus.

En el cruce recíproco, la posición de los cotiledones es hipógea, las flores son escarlatas y el estigma es parecido al de coccineus indicando que estas 3 características se encuentran bajo control tanto citoplásmico como nuclear (Ibrahim y Coyne, 1975).

En los cruces vulgaris x polyanthus, la germinación es epígea (ambos padres tienen una germinación epígea). Las flores son o moradas o blancas, pero nunca rojas (polyanthus no tiene flores escarlatas). Las bracteolas son largas y ovaladas y el estigma se extiende más sobre el lado interno del estilo que en los cruces con coccineus.

En cuanto a los cruces vulgaris x acutifolius, Smartt (1970) menciona que las F_1 recíprocas que consiguió tenían una morfología parecida. La textura de las hojas se acercaba más a la de vulgaris. Los caracteres de la inflorescencia y de las flores se parecían más a acutifolius: los racimos tenían pocas flores y las bracteolas eran pequeñas. El pecíolo de las hojas primarias en vulgaris es largo y consta de 3 partes:

el pulvínulo, el pecíolo y el peciolulo. En acutifolius, el pecíolo es corto y consta de una sola parte: el pulvínulo. El pecíolo largo de vulgaris es dominante sobre el pecíolo corto de acutifolius y esta diferencia morfológica cualitativa puede ser usada desde luego como un marcador temprano de hibridez en los cruces acutifolius x vulgaris.

El híbrido vulgaris x filiformis obtenido por Maréchal y Baudouin (1978) tenía hojas mucho más pequeñas que vulgaris, con folíolos agudos y lanceolados. Los racimos tenían 1 a 2 inserciones y las bracteolas eran intermedias, es decir pequeñas y lanceoladas (muy pequeñas y estrechas en filiformis). Las flores se parecían a las de filiformis.

7.2.- La F₂ y las generaciones siguientes.

Los datos para este parágrafo provienen únicamente de los cruces vulgaris x coccineus.

La F₂ y las generaciones siguientes de los cruces vulgaris x coccineus se caracterizan por 3 rasgos principales: una segregación muy importante, una desviación progresiva hacia el padre vulgaris y la aparición de caracteres nuevos que no se expresan en ninguno de los padres.

Debido a la alta heterocigotía de la generación F₁, se puede observar una gran variedad de tipos de plantas en la F₂. Cada planta es generalmente distinta de cualquier otra planta y muy pocas veces se parece a uno de los padres.

Si se consideran características individuales, se nota una desviación hacia el padre vulgaris. Lamprecht (1941) hizo observaciones sobre 5 caracteres que separan vulgaris de coccineus (la posición de los cotiledones, la inflorescencia, el color de la flor y del estigma y el tipo de semilla) en una población F₂ de 95 individuos. Los 5 caracteres fueron divididos en 3 categorías: parecido a vulgaris, intermedio o parecido a coccineus. El cuadro 23 presenta un resumen de los resultados.

Hubo una falta evidente de caracteres de coccineus en comparación con los de vulgaris. Lamprecht también anotó que la composición de la F₂ depende de la combinación de progenitores. En el ejemplo mencionado en el cuadro 23, una sola planta (de las 95) tenía los 5 caracteres parecidos a vulgaris. En otra población F₂, 67 plantas (de las 265 que conformaban esta población) tenían los 5 caracteres parecidos a vulgaris y no observó ninguna característica coccineus.

Además de ser muy poco frecuentes, dos características - el estigma tipo coccineus y la germinación hipogea - siempre son asociadas con una esterilidad muy alta o completa. Ha sido sugerido por Stebbins (1958) que los genes para esas características están ligados a factores que inducen la esterilidad en las progenies interespecíficas.

Pruebas adicionales de la segregación muy amplia y del

Cuadro 23. Frecuencia de caracteres parecidos a *vulgaris*, intermedios o parecidos a *coccineus* en una población F₂ de un cruzamiento *vulgaris* x *coccineus* (según Lamprecht, 1941).

Características	Parecida a <i>vulgaris</i>	Intermedia	Parecida a <i>coccineus</i>
Posición de los cotiledones	23	70	2
Inflorescencia	35	59	1
Color de flor	51	43	1
Estigma	26	69	0
Tipo de semilla	74	21	0
Total	209	262	4

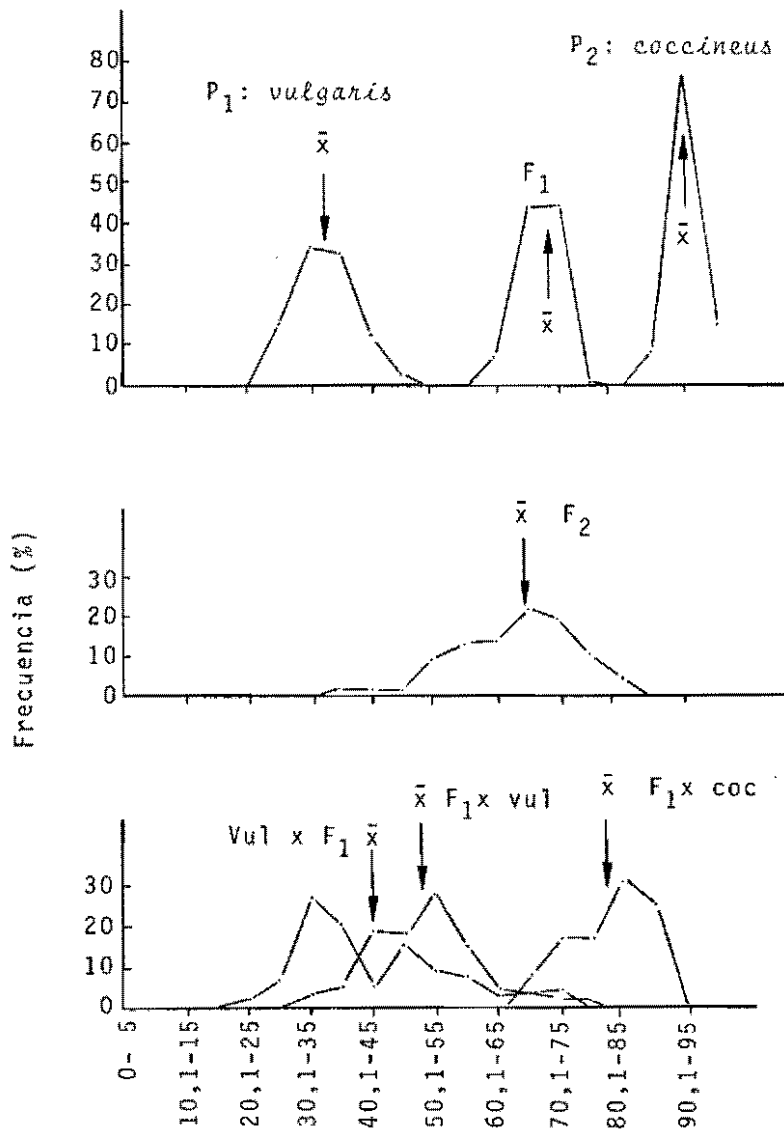
incremento hacia vulgaris fueron conseguidas por Wall y York (1957) que estudiaron la herencia de la posición de los cotiledones. Sus conclusiones se enumeran a continuación.

- i) En la F₁, la posición de los cotiledones era intermedia entre vulgaris y coccineus.
- ii) La F₂ tuvo aproximadamente el mismo promedio que la F₁, pero fué más variable ya que sus valores extremos coincidieron con los valores de los padres, aunque con frecuencias muy bajas, indicando una herencia cuantitativa. (Fig. 4)
- iii) La distribución en la F₂ fué significativamente sesgada hacia el padre vulgaris.
- iv) Los promedios de la F₃ y F₄ mostraron desviaciones sucesivas hacia el padre vulgaris, pero éstas progenies incluyeron algunas segregantes transgresiones con hipocotilos más cortos que los de coccineus (Fig. 5).

La F₂ y las generaciones siguientes de cruces con líneas de coccineus resistentes al mosaico amarillo, obtenidos por Rudorf (1955) y Baggett (1956), eran predominantemente susceptible y mostraban un rango muy amplio de síntomas, incluyendo síntomas atípicos y plantas infectadas sin síntomas.

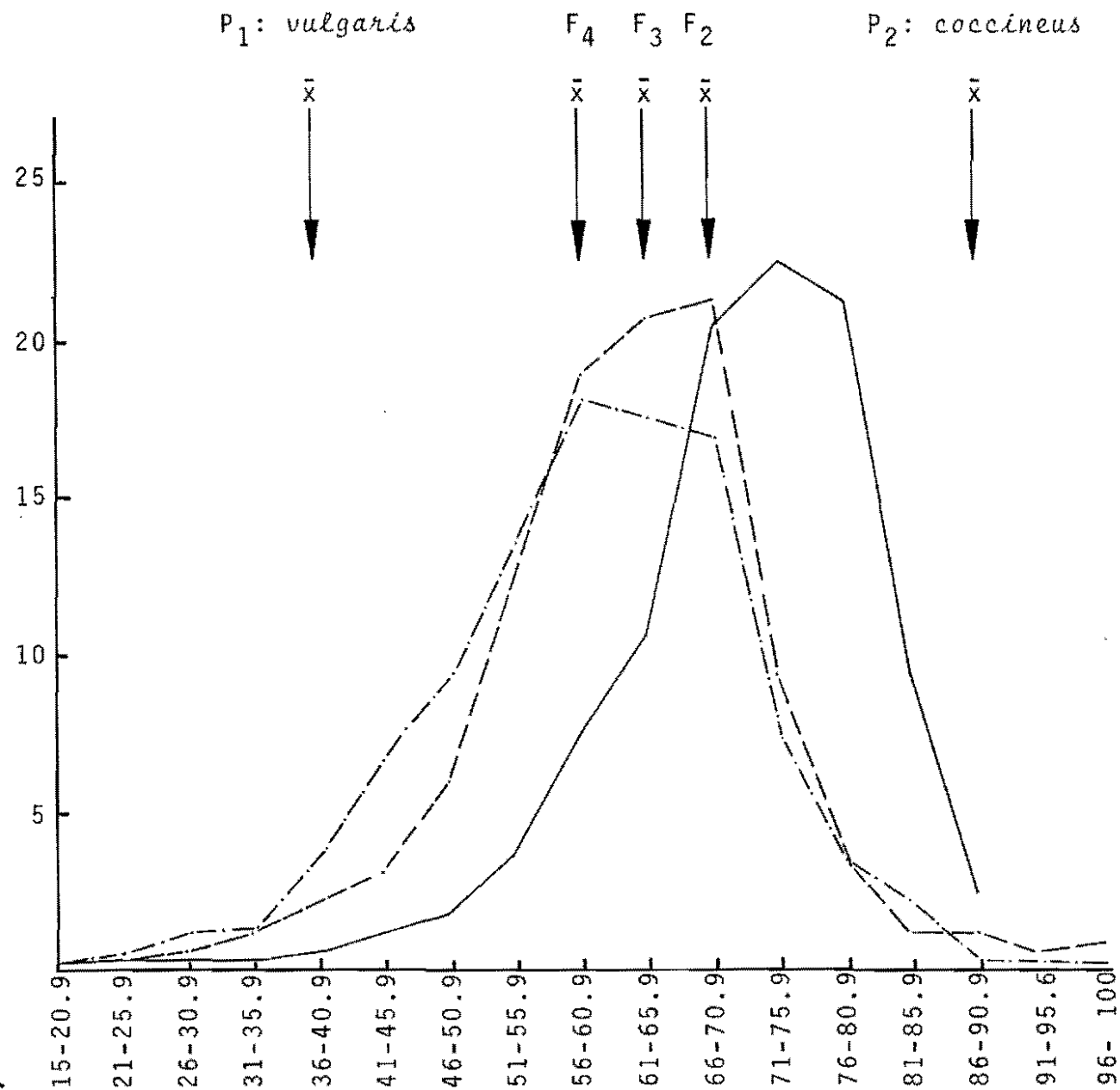
Nuevas características, no expresadas por ninguno de los padres, pueden aparecer en las progenies. Schwarze (1959)

FIGURA 4. POSICION DE LOS COTILEDONES EN LA F_1 , LA F_2 Y LOS RETROCRUZAMIENTOS DE UN CRUCE *vulgaris* x *coccineus* (según Wall, 1970)



Longitud del epicotilo en porciento de la longitud total hasta las hojas primarias

URA 5. DERIVA DE LA POSICION DE LOS COTILEDONES HACIA EL PADRE *vulgaris* EN LA F₂, F₃ y F₄ DE CRUCES *vulgaris* x *coccineus* (según Wall y York, 1957)



Longitud del epicotilo en porciento de la longitud total hasta las hojas primarias (— : F₂; - - - : F₃; - · - · : F₄)

analizó el contenido en flavonoides de las hojas de híbridos vulgaris x coccineus y encontró hasta 6 nuevos pigmentos flavonoides además de aquellos característicos de los padres. Menciona sin embargo, que a veces el padre coccineus mostraba cantidades muy bajas de flavonoides adicionales correspondientes a los nuevos flavonoides observados en los híbridos. La hibridación habría revelado un potencial que era latente en el padre coccineus.

7.3.- Segregaciones de algunas características.

Los datos para este párrafo provienen principalmente de observaciones personales, como también de los trabajos de Lamprecht (1941, 1948), quién es el investigador que más tiempo ha trabajado en los cruces vulgaris x coccineus, sin tener sin embargo, objetivos de mejoramiento claramente definidos.

Como ya se mencionó en el párrafo 7.2, existen dos tipos de variabilidad: una primera, que se origina en los padres y una segunda, "inesperada", que aparece por primera vez en las progenies. En cuanto a la variabilidad parental, la característica es transmitida de los padres a las progenies. En estas últimas, las segregaciones generalmente no siguen las leyes de Mendel, ya que existe una eliminación diferencial de características coccineus. La variabilidad inesperada no es expresada por ninguno de los padres y aparece por primera vez en las progenies. Rick (1967) definió cuatro orígenes distintos para este tipo de variación: interacción génica, interac-

ción citoplásmica, variación parental latente y mutación.

Para ambos tipos de variabilidad, se estableció en plan de manejo, que cuenta con las siguientes etapas:

1) Selección inicial: para la variabilidad de origen paternal, esta primera selección se hace en la F_2 ; mientras que para la variabilidad inesperada, se hace tanto en la F_2 , como en las generaciones subsiguientes de acuerdo al momento de aparición.

2) Prueba de progenie

3) Obtención de líneas interespecíficas: estas líneas se caracterizan por: - su mayor expresión posible de la característica asociada con buena viabilidad y fertilidad.

- su estabilidad ambiental.

- su facilidad de cruce con líneas interespecíficas vulgaris, que incluye un éxito alto del cruce y una buena viabilidad y fertilidad de las progenies.

Hasta la fecha, el material más avanzado (véase más adelante Follaje alto), ha pasado la prueba de progenie.

A continuación, una discusión de la variabilidad observada para algunas características de la arquitectura de la planta.

En cuanto a variabilidad de origen paterno:

1) Mecanismo de polinización cruzada.

El mecanismo de polinización cruzada de coccineus consta de 2 partes principales, el estigma terminal y las anteras bajas

(debajo del estigma). En las segregaciones se debe por lo tanto seleccionar estas 2 características.

En la F₂ y las generaciones siguientes, se observa una variación muy amplia en cuanto a la forma del estigma. Generalmente, aparece un estigma de tipo intermedio (ubicado a ambos lados de la parte terminal del estigma) o de tipo vulgaris. El estigma de tipo coccineus es más bien poco frecuente y es asociado con baja fertilidad.

La posición de las anteras también muestra una amplia variabilidad y se puede observar recombinaciones con el tipo de estigma: por ej.: se puede observar plantas con estigma del tipo vulgaris y anteras bajas.

Se seleccionan por lo tanto plantas con estigma intermedio y anteras bajas.

Queda también por determinar si se pueden conseguir líneas estables con estas características y cual es su herencia. Una herencia sencilla facilitaría mucho la transferencia de este mecanismo de polinización cruzada a líneas intraespecíficas vulgaris de los programas de mejoramientos.

2) Resistencia al volcamiento:

Existen dos causas de volcamiento: la más frecuente es la debilidad del sistema radicular, pero a veces se observa también roturas del tallo principal. Se pudo seleccionar en la F₂ plantas con un sistema radicular fuerte y/o un tallo principal

lignificado recto. Sin embargo, las progenies no volvieron a mostrar esas características y además tenían generalmente una viabilidad muy baja. Esta baja viabilidad se debe probablemente al alto número de características coccineus que tenían las selecciones. Además del sistema radicular desarrollado y del tallo lignificado, tenían flores, semillas, y vainas más bien parecidas a las de coccineus. Lamprecht (1941) ya había observado que a mayor número de caracteres coccineus, menor viabilidad de las progenies. Es preferible entonces seleccionar plantas que en la mayoría de sus características se parecen a vulgaris, pero que tengan 1 o 2 características de coccineus.

3.- Racimos con pedúnculos largos y alto número de vainas. Se observó variación en cuanto al largo del pedúnculo del racimo, así como el número de inserciones, el largo de los entrenudos y la dirección del racimo. En cuanto al número de vainas por racimo, se hicieron varias selecciones. La herencia sin embargo, parece ser muy baja, especialmente en los tipos arbustivos.

En cuanto a variabilidad inesperada, se observaron:

1) follaje alto: en la F₂ de un cruce entre vulgaris y polyanthus se seleccionó una planta con el hipocotilo y epicotilo largo. Se trata de una variabilidad inesperada ya que ninguno de los padres tiene un hipocotilo o epicotilo del largo observado en la progenie. Este material ha pasado ya la prueba de progenie. Se necesita ahora conseguir una línea ho-

mogénea arbustiva con buena viabilidad y fertilidad, averiguar la estabilidad ambiental y la facilidad de cruce con líneas vulgaris.

2) Foliólos estrechos.

Una planta con foliíolos estrechos posiblemente tendría una mejor distribución de la luz así como una mejor aeración del microambiente.

Se pudo seleccionar una planta arbustiva F_2 en un cruce vulgaris x coccineus con este tipo de foliíolos el cual fué parcialmente transmitido a su progenie. Con éste material, se realizarán las mismas operaciones como para el carácter anterior.

Es de anotar que dentro de vulgaris apareció también material con el mismo tipo de foliíolos.

3) Hojas reclinadas:

Se seleccionó en la F_3 de un cruce vulgaris x coccineus una planta trepadora con las hojas dirigidas hacia abajo. La característica es expresada en el tallo principal y en las porciones verticales de las ramas.

Las hojas reclinadas podrían mejorar la intercepción de los rayos solares y disminuir el "espacio vital" de la planta, con un posible aumento de la densidad de siembra como consecuencia.

Se necesita ahora probar la progenie de esta planta.

7.4.- Frecuencia de quiasmas en los cruces vulgaris x coccineus.

Desde el punto de vista de la segregación, deben mencionarse también las observaciones de Maréchal (1971) sobre las frecuencias de quiasmas. Híbridos interespecíficos F_1 entre P. vulgaris x P. coccineus mostraron una disminución marcada en el número de quiasmas en comparación con los padres (Cuadro 24). En estos, el número promedio de quiasmas por bivalente en la metafase era aproximadamente de 1,9, mientras que los híbridos mostraron promedios de 1,6 a 1,75.

Además, la distribución de quiasmas sobre los bivalentes sugiere que la reducción de su frecuencia afecta a todos los cromosomas y no está limitada a algunos cromosomas con heterocigotía de estructura.

7.5.- Progenies de retrocruzamientos.

Se ha mencionado anteriormente (véase parágrafo 6.3) que se pueden usar los retrocruzamientos para restaurar la fertilidad en progenies interespecíficas.

Sin embargo, los retrocruzamientos modifican la transferencia de genes de coccineus a vulgaris, como lo indicó Wall (1968, 1970). En un primer experimento, Wall (1968) examinó la herencia de la enzima leucina aminopeptidase (LAP) en cruces vulgaris x coccineus y los retrocruzamientos recíprocos hacia ambos padres. Los resultados indican que hubo una elimina-

Cuadro 24. Número promedio de quiasmas por bivalente en híbridos
F₁ *P. vulgaris* x *P. coccineus* y los padres.

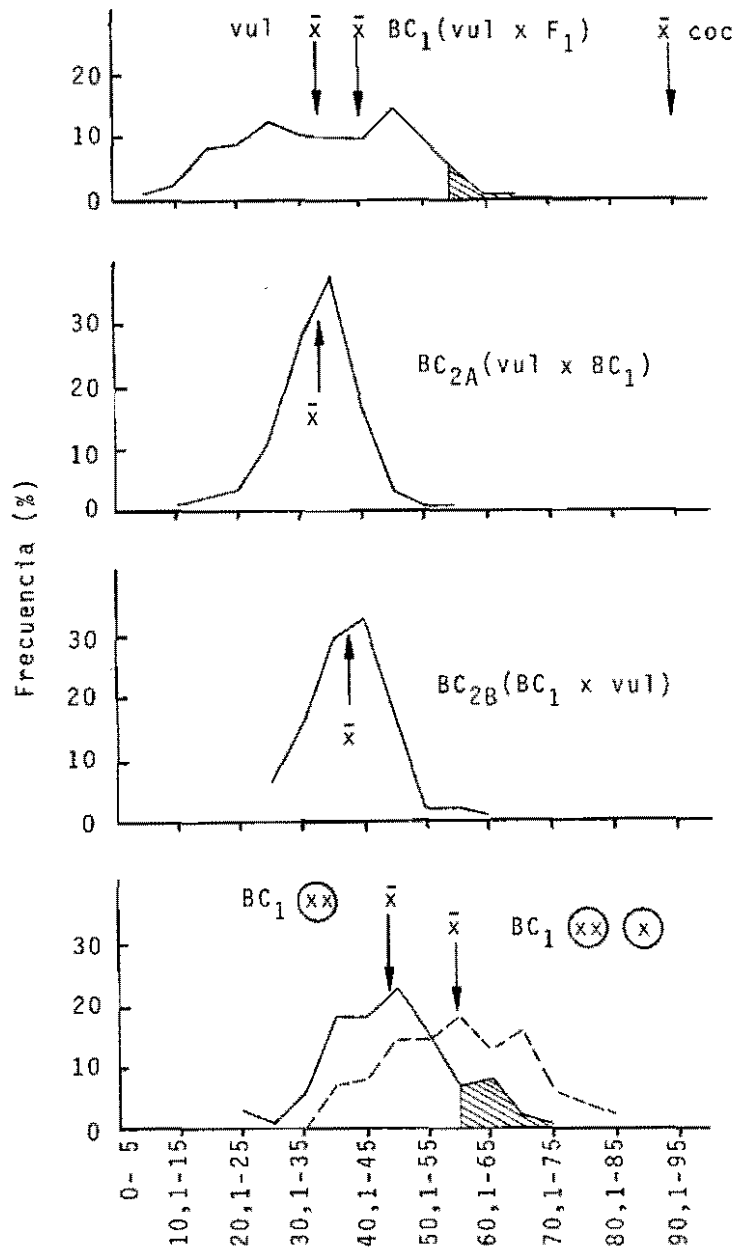
(Según Maréchal, 1971)

	Número promedio de quiasmas por bivalente.
<hr/>	
1. Padres:	
<i>P. vulgaris</i> : NI 34	1,954
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>coccineus</i> : NI 15	1,934
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>polyanthus</i> : NI 373	1,898
<i>P. coccineus</i> subsp. <i>formosus</i> : NI 88	1,880
2. Híbridos F ₁	
NI 34 x NI 15	1,758
NI 34 x NI 373	1,647
NI 34 x NI 88	1,608

ción selectiva del alelo LAP-II del padre donante (ó vulgaris ó coccineus) cuando era transmitido por los gametos masculinos. No hubo eliminación selectiva a través de los gametos femeninos. En un segundo experimento, Wall (1970) estudió el efecto de retrocruzamientos, de autopolinizaciones y de polinizaciones entre plantas hermanas sobre el tipo de germinación en las progenes de cruces vulgaris (germinación epigea) x coccineus (hipogea). Mas germoplasma del padre no-recurrente (coccineus) es transmitido por los gametos femeninos que por los gametos masculinos. Polinizaciones entre plantas hermanas y autopolinizaciones en las progenes de retrocruzamientos producen descendencias más parecidas a coccineus y con una variabilidad fenotípica más alta (Fig. 4 y 6). Estas descendencias también muestran un aumento en individuos mal balanceados como lo indican un porcentaje de germinación más bajo, una cierta proporción de individuos con viabilidad reducida y una fertilidad más baja en comparación con los padres y las poblaciones resultantes de retrocruzamiento recurrente. Sin embargo, la reducción de viabilidad y fertilidad no interfirió seriamente con el flujo de gene entre las dos especies.

Por lo tanto, se debe preferir las autopolinizaciones (y hasta cierto punto, las polinizaciones entre plantas hermanas que se demoran más) como sistema de apareamiento en las progenes de cruces vulgaris x coccineus, puesto que permiten conservar más germoplasma de coccineus. Sólo se deben usar los retrocruzamientos en las progenes muy estériles.

FIGURA 6. EFECTO DE RETROCRUZAMIENTOS RECÍPROCOS Y AUTOPOLINIZACIONES SOBRE LAS SEGREGACIONES EN CRUCES *vulgaris* x *coccineus* (según Wall, 1970)



Longitud del epicotilo en porciento de la longitud total hasta las hojas primarias

7.5.- Interpretación de las segregaciones en las proge-
nies de cruces vulgaris x coccineus.

En el transcurso de la evolución, ambas formas - vulgaris y coccineus - han formado genotipos y relaciones genotipo-citoplasma balanceados conduciendo a un desarrollo morfológico y fisiológico armonioso y a una adaptación a sus ambientes respectivos. La hibridación interespecífica destruye esos equilibrios genéticos como lo indican la viabilidad y/o fertilidad reducida en las generaciones tempranas.

Se esperaría que la F₂ tuviera una distribución bimodal de la morfología y la fertilidad: los individuos que se parecen más a uno de los padres tendrían también una viabilidad y una fertilidad más alta. Los individuos parecidos a la F₁ o aquellos que resultan de una redistribución aleatoria de los genes tendrían una viabilidad y fertilidad reducida.

Las plantas viables y fértiles resultarían de la unión de dos gametos, ambos parecidos a uno u otro tipo parental. Los gametos heterogéneos y los cigotos altamente heterocigotos tendrían respectivamente una funcionalidad o una viabilidad y fertilidad muy baja. Sería esta selección al nivel genotípico en los gametos y cigotos que produciría poblaciones bimodales.

Sin embargo, en los cruces vulgaris x coccineus las poblaciones F₂ son unimodales y sesgadas hacia vulgaris. Este

rasgo específico de las progenies vulgaris x coccineus puede posiblemente explicarse por la existencia de interacciones entre el genotipo y el citoplasma. Se trata de cruces realizados con vulgaris como madre y por lo tanto las progenies tienen un citoplasma tipo vulgaris. Los cigotos con un genotipo parecido a coccineus tendrían una viabilidad y fertilidad reducida. A consecuencia las progenies serían unimodales, teniendo el tipo vulgaris. La existencia de estas interacciones está indicada por ejemplo, por las diferencias recíprocas en la expresión de caracteres en la F₁ (posición de los cotiledones, color de flor, forma del estigma; véase parágrafo 7.1) y en los retrocruzamientos (véase parágrafo 7.4).

En resumen, se podría atribuir la pérdida de caracteres coccineus a una eliminación gamética y cigótica debida a interacciones genotípicas y genotipo-citoplasma.

8.- Algunos puntos prácticos:

8.1.- Selección de padres para un proyecto de cruzamiento interespecífico.

De los párrafos anteriores resalta que la combinación de padres es tal vez uno de los factores más importantes en el éxito de un cruce interespecífico. Influye en el éxito del cruce inicial, en la variabilidad y la fertilidad de las generaciones tempranas y en la transferencia de genes.

Según la combinación de especies involucradas en el cru-

zamiento, cambian los criterios usados en la selección de los padres cuando las barreras de aislamiento genético entre las dos especies no impiden la transferencia de genes, los padres deben tener las siguientes características:

- mostrar una expresión máxima del objetivo: por ejemplo, resistencia a una enfermedad como el mosaico dorado (BGMV).

- No tener caracteres indeseables, tal como susceptibilidades muy altas.

- Preferiblemente, estar adaptados al área de actuación, sobre todo el padre vulgaris.

- Se tiene que tener en cuenta el hábito (arbustivo o trepador), sobre todo para el padre vulgaris. Este es el caso de los cruces entre P. vulgaris y P. coccineus.

Si las barreras de aislamiento genético impiden la transferencia de genes (por ejemplo, falta de éxito del cruce inicial o esterilidad de la F_1), se debe poner énfasis en la compatibilidad de los padres. Se debe obtener combinaciones de padres que permitan superar estas barreras de aislamiento. Otras características de los padres, como adaptación o hábito solo empezarán a tener importancia en las etapas posteriores cuando se haya solucionado el problema de incompatibilidad.

Este es el caso de los cruces entre P. vulgaris y P. acutifolius.

Para ambos casos, es necesario usar numerosas accesiones de cada especie para obtener un alto número de combinaciones

parentales, puesto que no se puede predecir el resultado de los cruces. La Figura 7 muestra un ejemplo de un proyecto de cruzamiento para arquitectura de la planta con 4 líneas de coccineus seleccionadas por su epicotilo y pedúnculo largos. Cada línea representa una combinación F_1 . Cada combinación, sin embargo, no fue igualmente exitosa, ya que algunas produjeron enanos deformados y otras quedaron completamente estériles. Aún en las combinaciones que produjeron semillas, la variación en la fertilidad fue muy amplia.

8.2.- Aumento del tamaño de las poblaciones F_2

En vista de la fertilidad reducida de la F_1 , es preciso emplear todos los medios que conduzcan a una mayor producción de semillas en esta generación. Este aumento puede ser realizado principalmente en dos formas: siembra de la F_1 a una densidad muy baja en el campo (en vez del invernadero o de la casa de malla) y polinizaciones manuales de las plantas F_1 .

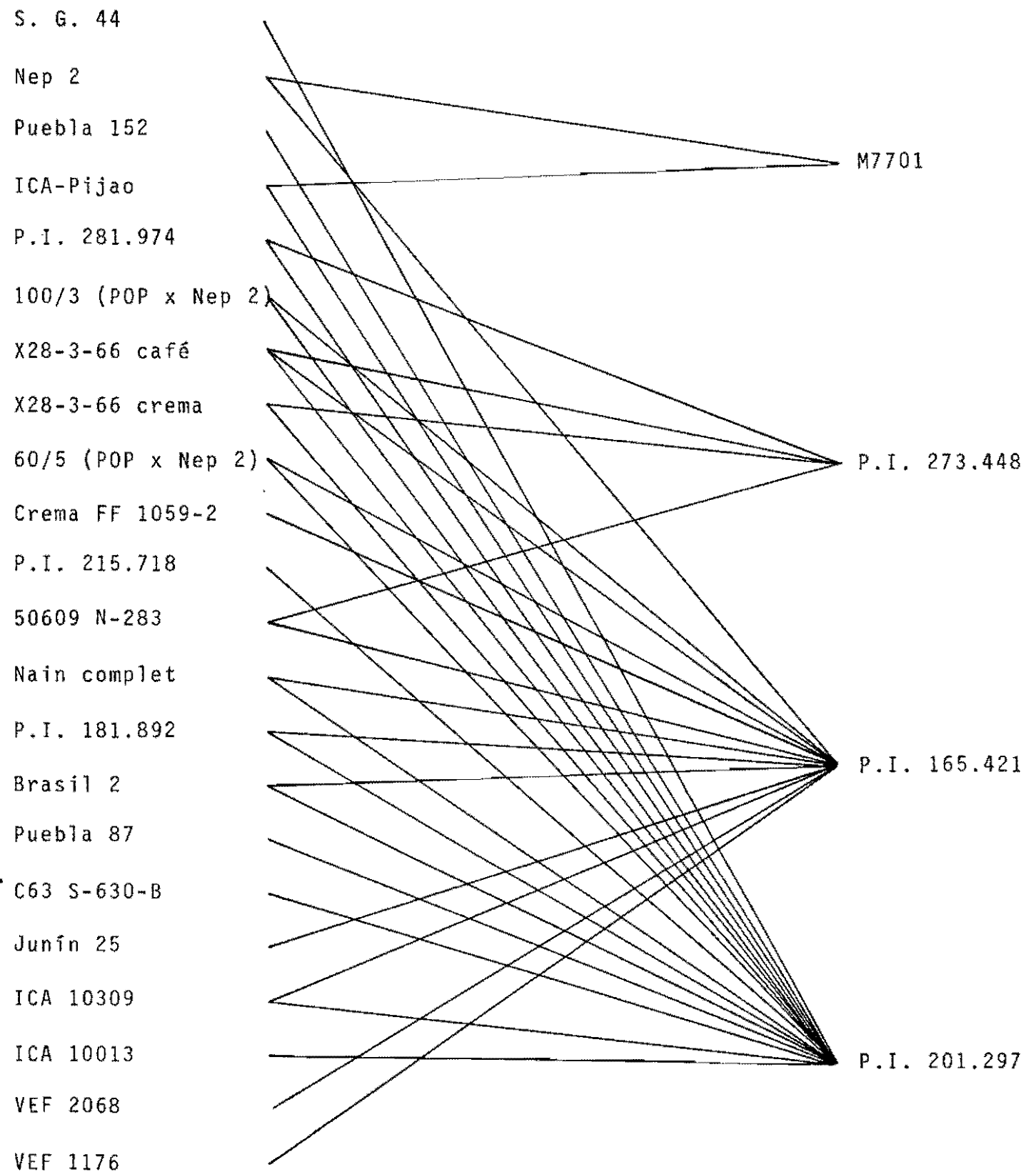
Se consiguió una producción de semillas considerablemente más alta en la F_1 sembrando esta generación en el campo a densidades bajas (1 m x 1 m o aún 2 m x 2 m), en comparación con siembras en potes (diámetro: 20 cm) en una casa de malla (Cuadro 25). Este incremento se debe sobre todo al volumen más alto de suelo disponible para las plantas que produce un desarrollo mucho más importante de los híbridos. Un factor adicional es la polinización por insectos (sea auto o alopolini-

FIGURA 7. PROYECTO DE CRUZAMIENTO PARA ARQUITECTURA DE PLANTA

COMBINACIONES HIBRIDAS F₁

P. vulgaris

P. coccineus subsp. *coccineus*



Cuadro 25. Producción de semillas por plantas F₁ en cruces *vulgaris* x *coccineus* y *vulgaris* x *polyanthus* en casa de malla y en campo.

Cruce	Casa de malla ^a		Campo ^b			
	Semillas por planta	Semillas por vaina	Semillas por planta	Semillas por vaina		
1. <i>vulgaris</i> x <i>coccineus</i>						
P.I.310.805	x	Puebla 56-C	25	1,3	203	1,5
Nep 2	x	NI 132	39	1,4	109	1,5
ICA-Palmar	x	NI 2	18	1,2	119	1,3
2. <i>vulgaris</i> x <i>polyanthus</i>						
NI 161	x	NI 520	89	1,2	330	1,3
ICA-Pijao	x	NI 490	85	1,1	1090	1,6

^a Casa de malla: potes de 20 cm de diámetro.

^b Campo: distancia de siembra: 1m x 1m.

zación) principalmente por abejorros.

Hay que subrayar que las condiciones tropicales prevalentes en Colombia no limitan el ciclo de vida de los híbridos F_1 , como en las regiones templadas. Por lo tanto, estas plantas tienen un período de producción bastante largo.

Para reducir al mínimo las pérdidas de semillas F_1 por la siembra en campo, se toman las precauciones siguientes: Se someten las semillas F_1 a una esterilización de superficie con NaClO (5% por 1 mm.) y luego se colocan las semillas en cajas Petri sobre papel filtro humedecido. Cuando aparece la raíz, se transfieren a suelo esterilizado en materas desechables. Al tener las hojas primarias completamente extendidas, las plántulas se transfieren al campo. Para evitar las pérdidas por insectos trozadores, se coloca alrededor de las plantas un cebo hecho con salvado de maíz, miel de purga y clordane.

Las polinizaciones manuales también pueden aumentar la producción de semillas, especialmente en los cruces vulgaris x coccineus (Cuadro 17). Se realizan estas polinizaciones en todas las flores recién abiertas a una frecuencia lo más alta posible (hasta 1 o 2 veces por semana).

Como ejemplo, el cuadro 26 da el número de semillas producidas por plantas F_1 de un proyecto de cruzamiento para arquitectura de planta. Para algunos cruces se observó una producción importante de semillas, que puede ser atribuida a la

Cuadro 26. Proyecto de cruzamiento para arquitectura de planta. Producción de semillas F₂

Cruce	Semillas/planta ^a
1. <i>Vulgaris</i> x <i>coccineus</i> :	
X 28-3-66 café X P.I. 165.421	2731
Nep 2 X P.I. 165.421	1077
Junín 25 X Hammond's Dwarf	356
60/5 (Pop x Nep 2) x P.I. 165.421	279
C 63 S-630-B X P.I. 201.297	239
ICA 10309 X P.I. 273.448	48
X28-3-66 Café X P.I. 201.297	8
2. <i>Vulgaris</i> x <i>polyanthus</i> :	
C 63 S-630-B X N.I. 373	1896
X 28-3-66 Café X N.I. 373	1119
Brasil 2 X N.I. 373	452

^a Duración de cosecha : aprox. 4-5 meses.

siembra en campo, las autopolinizaciones manuales realizadas y a la duración del período de cosecha. Se pudo notar otra vez, la mayor producción de semillas en promedio en los híbridos vulgaris x polyanthus.

9.- Conclusiones

Las relaciones de cruzamiento entre especies pueden describirse de acuerdo a los tres parámetros siguientes: la facilidad de cruzamiento, la viabilidad y la fertilidad de las progenies, la segregación y la transferencia de genes en las progenies.

En base a estos tres parámetros, se puede clasificar cada especie silvestre* en uno de los tres reservorios genéticos ("gene-pools") de las especies cultivadas, P. vulgaris en este caso (Harlan y De Wet, 1971).

En el reservorio genético primario (GP₁), el cruzamiento es fácil, los híbridos tienen una buena viabilidad y fertilidad, las segregaciones son normales y la transferencia de genes es fácil. El GP₁ contiene las formas cultivadas y silvestres de P. vulgaris, que pueden considerarse como conspecíficas. El gene-pool secundario (GP₂) contiene las especies con las cuales el cruzamiento es menos fácil; los híbridos tienden a tener una viabilidad y/o fertilidad reducida; la segregación es anormal y la obtención de tipos deseables en las generaciones avanzadas puede ser difícil.

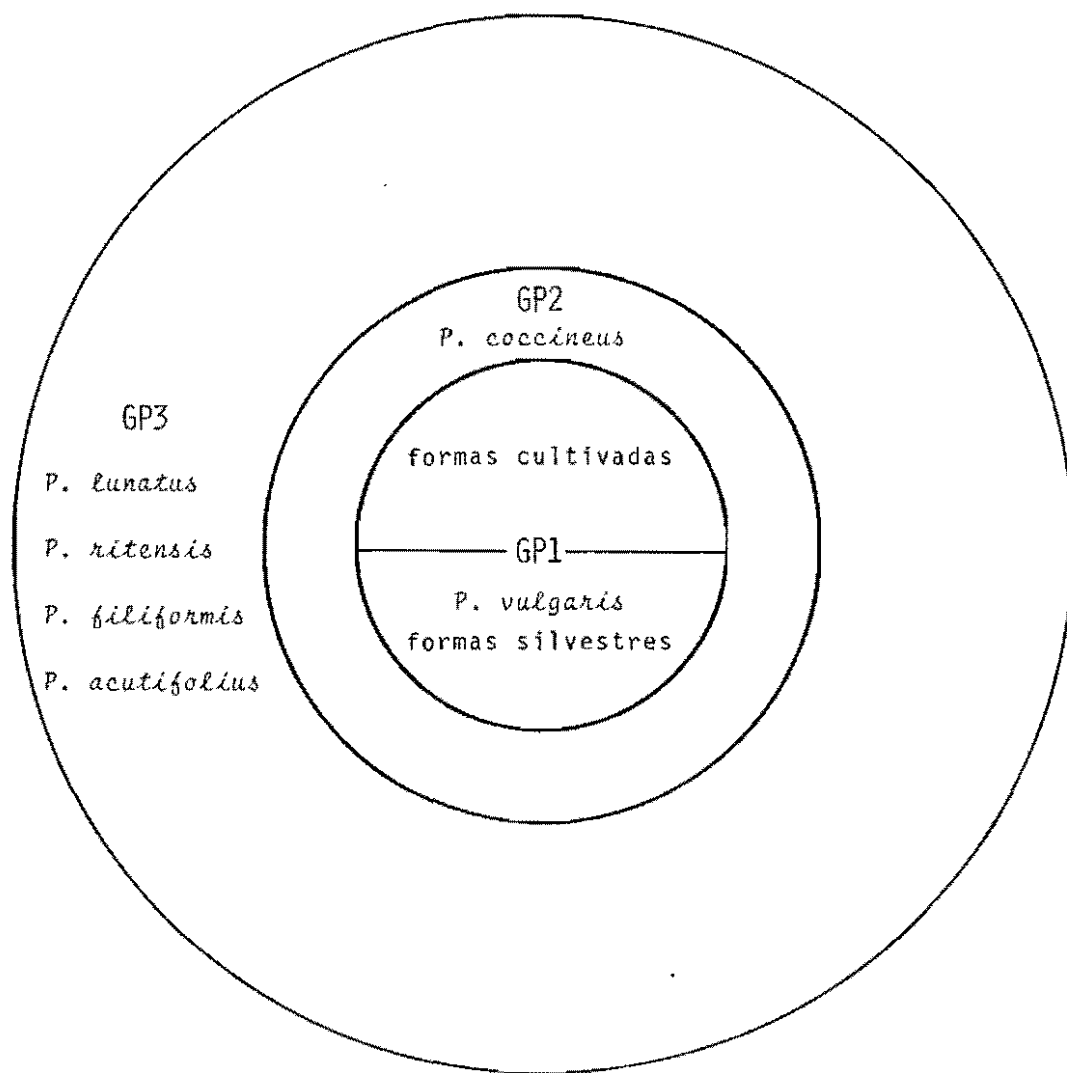
El GP₂ incluye a P. coccineus.

* Véase parágrafo 2.1.

Con las especies del reservorio genético terciario (GP₃), el cruzamiento es difícil y puede necesitar técnicas especiales, tal como el cultivo de embriones, los híbridos tienden a tener una viabilidad y/o fertilidad muy reducida. El GP₃ incluye a especies como P. acutifolius, P. filiformis, P. lunatus, P. ritensis, etc. (Fig. 8).

Esta clasificación puede modificarse todavía a medida que se consiga más información sobre el cruzamiento con especies menos estudiadas de Phaseolus y sobre las formas de aumentar el éxito el cruzamiento, de restaurar la viabilidad y la fertilidad y mejorar la transferencia de genes. Por ejemplo, en el futuro se podría llegar a incluir P. acutifolius en el GP₂ en lugar del GP₃. Aunque P. acutifolius presenta algunas características muy interesantes tal como su tolerancia a sequía, su resistencia a Empoasca kraemeri y Xanthomonas phaseoli, que justificarían su uso en un proyecto de cruces interespecíficos, el cruce de esta especie con P. vulgaris queda caracterizado por serios problemas de cruzamiento, viabilidad y fertilidad. Además, la transferencia de caracteres, especialmente los cuantitativos, podría ser bastante difícil por la reducción del apareamiento de las cromosomas y una posible reducción de la frecuencia de los quiasmas. También los caracteres positivos de las accesiones de esta especie pueden estar asociados con caracteres negativos por ejemplo, un tipo de planta postrado, susceptibilidades a enfermedades y plagas.

RA 8. RELACIONES DE CRUZAMIENTO ENTRE *P. vulgaris* Y ALGUNAS ESPECIES DE *Phaseolus*



En cuanto a los cruces entre P. vulgaris y P. coccineus, se ha mostrado el interés especial que puede tener P. coccineus subsp. polyanthus. La progenies F₁ de los cruces con P. vulgaris nunca han enseñado un tipo anormal como en los vulgaris x coccineus. Además, los híbridos tienden a tener una mejor viabilidad y fertilidad.

Es preciso empezar una evaluación intensiva del germoplasma de polyanthus. También sería útil investigar si existe en los cruces vulgaris x polyanthus una eliminación de genes de polyanthus parecida a la eliminación de genes de coccineus en los cruces vulgaris x coccineus.

10.- Bibliografia

- AKEHURST, B. (1968). Tobacco. Humanities Press, New York, 551 pp.
- ADAMS, P.B., TATE, C.J., LUMSDEN, R.D. & MEINERS, J.P. (1973).
Resistance of Phaseolus species to Sclerotinia sclerotiorum.
Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 16: 8-9.
- AL-YASIRI, S. & COYNE, D.P. (1964). Effect of growth regulators
in delaying pod abscission and embryo abortion in the inter-
specific cross Phaseolus vulgaris x P. acutifolius. Crop.
Sci. 4. 433-435.
- AL-YASIRI, S.A. & COYNE, D.P. (1966). Interspecific hybridi-
zation in the genus Phaseolus. Crop Sci. 6: 59-60.
- BAGGETT, J.R. (1956). The inheritance of resistance to strains
of bean yellow mosaic virus in the interspecific cross
Phaseolus vulgaris x P. coccineus. Pl. Dis. Rep. 40: 702-
707.
- BAGGETT, J.R. & FRAZIER, W.A. (1959). Disease resistance in the
runner bean, Phaseolus coccineus. Pl. Dis. Rep. 43: 137-143.
- BAGGETT, J.R., FRAZIER, W.A. & McWHORTER, F.P. (1966). Sour-
ces of virus resistance in beans. Pl. Dis. Rep. 51: 532-536.
- BEMIS, W.P. & KEDAR, N. (1961). Inheritance of morphological
abnormalities in seedlings of two species of Phaseolus. J.
Hered. 52: 171-178.
- BERGLAND-BRUCHER, O. & BRUCHER, H. (1974). Murutungo, eine semi-
domestizierte Wildbohne (Phaseolus flavescens Piper) aus
den tropischen Gebirgen Südamerikas. Angew. Botanik 48:
209-220.
- BRAAK, J.P. & KOOISTRA, E. (1975). A successful cross between
Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus ritensis Jones with the
aid of embryo culture. Euphytica 24: 669-679.

- BUISHAND, T. (1956). The crossing of beans (Phaseolus spp.)
Euphytica 5: 41-50.
- CIONINI, P.G., BENNICI, A., ALPI, A. & D'AMATO, F. (1976).
Suspensor, gibberellin and in vitro development of Phaseolus
coccineus embryos. Planta 131: 115-117.
- COYNE, D.P. (1964). Species hybridization in Phaseolus. J. Hered.
55: 5-6.
- DE MARLEY, Y. (1977). Génétique et amélioration des plantes.
Masson, Paris, 287 pp.
- DHALIWAL, A.S., POLLARD, L.H. & LORZ, A.P. (1962). Cytological
behaviour of an F₁ species cross (Phaseolus lunatus L. var.
Fordhook x Phaseolus polystachyus L.). Cytologia (Tokyo)
27: 369-374.
- DOSBA, F. & DOUSSINAULT, G. (1977). Introduction into wheat
of the resistance to eyespot in Aegilops ventricosa. In:
Proc. VIIIth, Congr. Eucarpia. Interspecific hybridiza-
tion in plant breeding, eds. E. Sanchez-Monge & F. García-
Olmedo: p. 99-107.
- DICKSON, M.H. & BOETTGER, M.A. (1977). Screening plant intro-
ductions for Pythium and Fusarium resistance. Ann. Rept.
Bean Improv. Coop. 20: 80-81.
- HAGEDORN, D.J. & RAND, R.E. (1976). Resistance in Phaseolus
coccineus to bean bacterial brown spot. Ann. Rep. Bean
Improv. Coop. 19: 41-43.
- HAHN, S.K. (1978). Breeding of cassava for resistance to cas-
sava mosaic disease (C.M.D.) and bacterial blight (C.B.B.)
in Africa. In: Proc. Int. Symp. Diseases Trop. Food Crops,
Louvain - la - Neuve, eds. H. Maraité & J. Meyer: p. 211-
219.

- HAQ, N., SMARTT, J. & LANE, G.R. (1973). Causes of interspecific hybrid abortion in Phaseolus. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 16: 31-32.
- HARLAN, J.R. (1976). Genetic resources in wild relatives of crops. Crop. Sci. 16: 329-333.
- HARLAN, J. R. & DE WET, J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon 20: 509-517.
- HAWKINS, C.F. & EVANS, A.M. (1973). Elucidating the behaviour of pollen tubes in intra-and interspecific pollinations of Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus Lam. Euphytica 22: 378-385.
- HERNANDEZ-XOLOCOTZI, E., MIRANDA-COLIN, S. & PRYWER, C. (1959). El origen de Phaseolus coccineus L. darwinianus HDZ. X & Miranda - C., subspecies nova. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 20: 99-121.
- HUBBELING, N. (1957). New aspects of breeding for disease resistance in beans (Phaseolus vulgaris L.). Euphytica 6: 111-141.
- IBRAHIM, A.M. (1974). Interspecific hybridization between Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus coccineus Lam. Ph.D. thesis, University of Nebraska, 130 pp.
- IBRAHIM, A.M. & COYNE, D.P. (1973). Interspecific hybridization between Phaseolus vulgaris and Phaseolus coccineus. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 19:52.
- IBRAHIM, A.M. & COYNE, D.P. (1975). Genetics of stigma shape, cotyledon position and flower color in reciprocal crosses between Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus coccineus Lam. and implications in breeding. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 622-626.
- KEDAR, N. & BEMIS, W.P. (1960). Hybridization between two

- species of Phaseolus separated by physiological and morphological blocks. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 76: 397-402.
- KLOZ, J. (1971). Serology of the Leguminosae. In: Chemotaxonomy of the Leguminosae, eds. Harbone, J.B., Boulter, D. & Turner, B.L. Academic Press, London: p. 309-365.
- KROH, M. (1962). Vergleichende Untersuchungen an Phaseolus coccineus - Selbstungen und Kreuzungen Zwischen Ph. vulgaris und Ph. coccineus. Z. Pfl. Zucht. 47: 201-216.
- LAMPRECHT, H. (1939). The limit between Phaseolus vulgaris and Ph. multiflorus from the genetical point of view. In: Proc. 7th Int. Genet. Congr., Edinburgh, 1939, ed. R.C. Punnett: 179-180.
- LAMPRECHT, H. (1941). Die Artgrenze zwischen Phaseolus vulgaris L. und multiflorus Lam. Hereditas 27: 51-175.
- LAMPRECHT, H. (1948). Zur Losung des Artproblems. Neue und bisher bekannte Ergebnisse der Kreuzung Phaseolus vulgaris L. x coccineus L. und reziprok. Agr. Hort. Genet. 6: 87-241.
- LE MARCHAND, G. (1971). Observations sur quelques hybrides dans le genre Phaseolus. I. Le probleme des incompatibilités interspécifiques. Bull. Rech. Agron. Gembloux 6: 441-452.
- LE MARCHAND, G., MARECHAL, R. & BAUDET, J.C. (1976). Observations sur quelques hybrides dans le genre Phaseolus. III. P. lunatus: nouveaux hybrides et considérations sur les affinités interspécifiques. Bull. Rech. Agron. Gembloux 11: 183-200.
- LORZ, A.P. (1952). An interspecific cross involving lima bean Phaseolus lunatus L. Science 115: 702-703.
- MARECHAL, R. (1971). Observations sur quelques hybrides dans le genre Phaseolus. II. Les phenomenes meiotiques. Bull. Rech. Agron. Gembloux 6: 461-489.

- MARECHAL, R. & BAUDOUIN, J.P. (1978). Observations sur quelques hybrides dans le genre Phaseolus. IV. L'hybride Phaseolus vulgaris x Phaseolus filiformis. Bull. Rech. Agron. Gembloux. 13: 233-240.
- MARECHAL, R. & BAUDOUIN, J.P. (1980). Personal communication.
- MARECHAL, R., MASCHERPA, J.M. & STAINIER, F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. Boissiera, Geneve, Vol. 28, 273 pp.
- MENDEL, G. (1866). Versuchen uber Pflanzen-hybriden. Verh. Naturforsch. Verein Brunn 4: 3-47.
- MIRANDA COLIN, S. (1967). Infiltración genética entre Phaseolus coccineus L. y Phaseolus vulgaris L. Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados, Serie Investigación No. 9, 48 pp.
- MOK, D.W.S., MOK, M.C. & RABAKOARIHANTA, A. (1978). Interspecific hybridization of Phaseolus vulgaris with P. lunatus and P. acutifolius. Theor. Appl. Genet. 52: 209-215.
- NAGL, W. (1969). Banded polytene chromosomes in the legume Phaseolus vulgaris. Nature 221: 70-71.
- PIPER, C.V. (1926). Studies in American Phaseolinae. Contr. U.S. Nat. Herb. 22: 663-701.
- RABAKOARIHANTA, A., MOK, D.W.S. & MOK, M.C. (1979). Fertilization and early embryo development in reciprocal interspecific crosses in Phaseolus. Theor. Appl. Genet. 54: 55-59.
- RABAKOARIHANTA, A. SHII, C.T., MOK, M.C. & MOK, D.W.S. (1980). Meiosis and fertility of interspecific hybrids between Phaseolus vulgaris L. and P. acutifolius A. Gray. Theor. Appl. Genet. 57: 59-64.

- RICK, C.M. (1967). Exploiting species hybrids for vegetable improvement. Proc. XVII Int. Hort. Congr. 3: 217-229.
- RUDORF, W. (1955). Die Übertragung der Resistenz gegen Bohnenmosaik-Viren 1 (gewöhnliches Bohnenmosaik) und 2 (gelbes Bohnenmosaik) aus Phaseolus coccineus in fertile bastardpflanzen aus der Kreuzung Phaseolus vulgaris x Phaseolus coccineus. Naturwissenschaften 42: 19-20.
- RUDORF, W. (1961). Untersuchungen über die bei der Bastardierung von Phaseolus vulgaris L. ♀ x Phaseolus coccineus L. ♂ und der reziproken Bastardierung auftretenden besonderen Probleme. II. Untersuchungen über die Genetik der Spaltung der F₁. Z. Pfl. Zucht. 46: 307-324.
- SCHWARZE, P. (1959). Untersuchungen über die gesteigerten Flavonoid-Produktion in Phaseolus - Artbastarden (Phaseolus vulgaris x Phaseolus coccineus). Planta 54: 152-161.
- SMARTT, J. (1970). Interspecific hybridization between cultivated American species of the genus Phaseolus. Euphytica 19: 480-489.
- SMARTT, J. & HAQ, NAZMUL (1972). Fertility and segregation of the amphidiploid Phaseolus vulgaris L. x Phaseolus coccineus L. and its behaviour in backcrosses. Euphytica 21: 496-501.
- STAINIER, F. (1974). Contribution a l'étude palynologique des Papilionaceae-Phaseoleae-Phaseolinae. III. Etude de quelques espèces des genres Phaseolus L., Vigna Savi et Physostigma BALF. Bull. Jard. Bot. Natl. Belg. 44: 1-15.
- STEBBINS, G.L. (1958). The inviability, weakness and sterility of interspecific hybrids. Adv. in Genet. 9: 147-215.
- THOMAS, H. (1964). Investigations into the interrelationship of Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus Lam. Genetica 35: 59-74.

- WALL, J.R. (1968). Leucine aminopeptidase polymorphism in Phaseolus and differential elimination of the donor parent genotype in interspecific backcrosses. *Biochem. Genet.* 2: 109-118.
- WALL, J.R. (1970). Experimental introgression in the genus Phaseolus. I. Effect of mating systems on interspecific gene flow. *Evolution* 24: 356-366.
- WALL, J.R. & YORK, T.L. (1957). Inheritance of seedling cotyledon position in Phaseolus species. *J. Heredity* 48: 71-74.