

T
634.772
SANC
C.2



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Caracterización de la variación somaclonal generada en
propagación masiva *in-vitro* de banano, var. Williams."

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentada por:

James Manuel Sangster Infante

GUAYAQUIL-ECUADOR

AÑO: 2001



AGRADECIMIENTO

A mi familia que ha estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional durante todo este proceso, al Director y al Vocal de mi Tesis, a los científicos que supieron compartir sus conocimientos, a mis compañeros que se esforzaron y tuvieron mucha paciencia durante cuatro años y sobretodo a Dios Padre Todopoderoso.

DEDICATORIA



A MI MADRE

A MIS HERMANOS

A MI TIA BLANCA

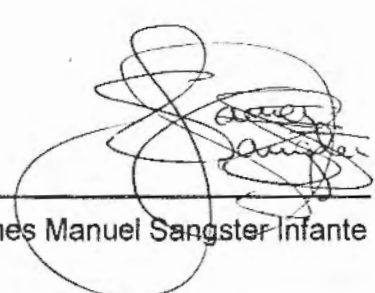
A MI PRIMA GRACE

A MIS SOBRINOS

DECLARACIÓN EXPRESA

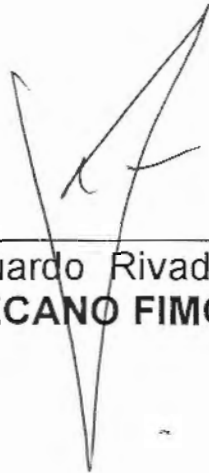
“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



James Manuel Sangster Infante

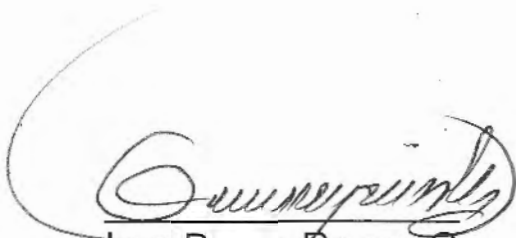
TRIBUNAL DE GRADO



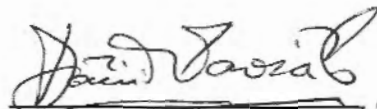
Ing. Eduardo Rivadeneira P.
DECANO FIMCP



Ing. Alberto Ortega U.
DIRECTOR DE TESIS



Ing. Bruno Reyna G.
VOCAL



Ing. Daniel Navia M.
VOCAL

RESUMEN

El uso de plantas obtenidas *in vitro* es una de las técnicas más reconocidas durante la última década.

La micropropagación tiene las ventajas de utilizar espacios pequeños en laboratorios y las plantas así obtenidas pueden producir altos rendimientos. Sin embargo, el costo de las vitroplantas es alto comparado al sistema tradicional. Por otro lado, puede ser un riesgo inducir variaciones atípicas, las que podrían generarse como producto de un incorrecto manejo y control en el uso de los medios de cultivos o a la vez una mala selección del material.

Para establecer un porcentaje de daños eventuales en el genoma de *Musa* inducido durante el cultivo *in vitro*, se desarrolló una investigación de campo estableciéndose primero la caracterización fenotípica de las plantas donantes para la multiplicación *in vitro* y luego ubicando en campo las variantes fenotípicas en plantas micropropagadas *in vitro* y sembradas en la Hacienda "La Maravilla" del Señor Euclides Palacios, productor de la Provincia de El Oro, ubicada en Barbones.

Esta evaluación se realizó entre los meses de Enero a Mayo del año 2001.

La plantación proveniente de cultivos *in-vitro* de la empresa SEBIOCA, cuenta con 9000 plantas de la variedad "Williams" las cuales fueron evaluadas por observación encontrando 143 variantes atípicas (1.59%) que fueron caracterizadas con descriptores para el banano recomendados por INIBAP (Red Internacional para el Mejoramiento del banano y el Plátano). Adicionalmente, el carácter altura del pseudotallo menor a 2 metros (enanitas) con un 83.92%

CAPÍTULO 2

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BANANO CULTIVADO IN VITRO.

2.1 Descriptores.....	61
2.2 Lista seleccionada para la caracterización de la variación somaclonal en <i>Musa acuminata</i> , grupo Cavendish, variedad Williams.....	63
2.3 Registro de datos.....	72

CAPÍTULO 3

3. METODOS DE EVALUACION.

3.1 Variables en estudio.....	79
3.2 Diseño experimental.....	81

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
-----------------------------	----

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	95
-------------------------------------	----

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

AIA	Acido Indol Acético
AIB	Acido Indol Butírico
ANA	Acido Naftalen Acético
BAP	Benzilaminopurina
CMV	Virus del mosaico (Cucumber Mosaic Virus)
GA3	Acido Giberélico
m	metro
mm	milímetro.
<i>M.</i>	<i>Musa</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
ssp	Subespecie

SIMBOLOGÍA

AAA	Triploide, triple acuminata.
AA	Diploide, doble acuminata.
AAB	Triploide acuminata, balbisiana.
AAAB	Tetraploides acuminata, balbisiana
Fm	Hoja normal
Df	Diferenciación floral

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Porcentaje de plantas atípicas de la variedad Williams, ob- Tenidas en la Hda. "La Maravilla" del Señor Euclides Pa- Lacios, Provincia de El Oro, Mayo del 2001.....	83
Figura 2 Histograma representativo para hábito foliar	85
Figura 3 Histograma representativo para enanismo.....	86
Figura 4 Histograma representativo para altura del pseudotallo.....	88
Figura 5 Histograma representativo para color del pseudotallo.....	90
Figura 6 Histograma representativo para manchas en la base del pe- cíolo.....	91
Figura 7 Histograma representativo para longitud de la lámina.....	93
Figura 8 Histograma representativo para ancho de la lámina.....	94

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Incidencia y variantes atípicas, reportadas de bananos (AAA) propagados in vitro.....51
Tabla 2	Incidencia y variantes atípicas, reportadas de plátanos (AAB) propagados in vitro.....52
Tabla 3	Características diferenciales de algunos tipos de plantas con respecto al hábito foliar, enanismo, altura y color del pseudotallo.....73
Tabla 4	Características diferenciales de algunos tipos de plantas con respecto al color subyacente del pseudotallo, cera en las vainas, emergencia de hijos, mancha y color en la base del pecíolo y canal peciolar de la tercera hoja.....74
Tabla 5	Características diferenciales de algunos tipos de plantas con respecto al color de los márgenes y longitud del pecíolo; longitud, ancho y color de la cara superior de la lámina.....75
Tabla 6	Características diferenciales de algunos tipos de plantas con

	respecto al color de la cara inferior , presencia de cera, inserción y forma de la base de la lámina; pubescencia del pedúnculo y posición del racimo.....	76
Tabla 7	Características diferenciales de algunos tipos de plantas con respecto al racimo, frutos y raquis.....	77
Tabla 8	Distribución de frecuencias para hábito foliar.....	84
Tabla 9	Distribución de frecuencias para enanismo.....	85
Tabla 10	Distribución de frecuencias para altura del pseudotallo.....	87
Tabla 11	Distribución de frecuencias para color del pseudotallo.....	88
Tabla 12	Distribución de frecuencias para manchas en la base del pecíolo.....	90
Tabla 13	Distribución de frecuencias para longitud de la lámina.....	92
Tabla 14	Distribución de frecuencias para ancho de la lámina.....	93

INTRODUCCIÓN

El banano es una monocotiledónea que pertenece al género *Musa*. Originaria del Sudeste de Asia; desde donde se extendió a diferentes partes del mundo como consecuencia de la introducción de especies ocasionada por la migración del hombre.

El banano es el cuarto producto con importancia alimenticia a nivel mundial, es cultivado en más de 100 países alrededor del mundo en zonas tropicales y subtropicales, se ha desarrollado en un área de aproximadamente diez millones de hectáreas con una producción anual de 88 millones de toneladas métricas (INIBAP-IPGRI, 1998. Annual Report). En algunos países no solamente es aprovechado como alimento, puede ser también una excelente fuente de fibra y puede fermentarse para la producción de alcohol.

Las *Musas* pueden ser diploides o poliploides (triploides y tetraploides), híbridos naturales entre dos especies, *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B). La parte principal de la producción viene de triploides cuyas semillas no son fértiles y por lo tanto tienen que ser propagados vegetativamente.

El Ecuador es el primer exportador de banano en el mundo logrando exportar 4'838000 toneladas al año (1999), actualmente cuenta con 140000 hectáreas (Ministerio de Agricultura 2000).

Entre los cultivos sembrados en grandes extensiones, el banano es uno de los más propagados, la producción mundial suma aproximadamente 50 millones de plantas por año (INIBAP-IPGRI, 1998. Annual Report).

La utilización de plantas propagadas *in vitro* reviste importancia para los productores puesto que al ser una reproducción asexual, pueden seleccionarse los mejores individuos para la propagación asumiendo que conservarán los caracteres genotípicos y fenotípicos para garantía de eficiencia del productor.

Sin embargo, en los laboratorios pueden ocurrir algunas alteraciones en el genotipo y fenotipo producto de la acción incontrolada de los reguladores de crecimiento, que determinan alteraciones en el genoma nuclear o extranuclear, cosa que se expresa en el fenotipo. Stover (1987) indica que menos del 5% de las plantas con variación, es un parámetro aceptable para la producción a escalas comerciales, desde la fase de laboratorio hasta el campo. Vale la pena destacar que existen resultados contradictorios que a la

vez han generado muchas discusiones al respecto cuestionando estas técnicas.

La variedad Williams presenta rangos de variación somaclonal, en algunos casos con promedios de 0-8.4% (Reuveni et al., 1986), otros autores mencionan promedios de hasta 50% (Daniells, 1988), muchos de estos con variación que tiende a enanas.

Frente a las opciones es necesario establecer parámetros morfológicos de esta expresión, lo que permite en primer lugar establecer el porcentaje de daños ocurridos en la micropropagación y el eventual apareamiento de una variante somaclonal promisorio.

Esta investigación cobra importancia cuando existen en el país varios laboratorios dedicados a la propagación *in vitro* de plantas y por otro lado varios productores bananeros han hecho importaciones significativas de este material desde diferentes países y solo han reportado porcentajes importantes de mortalidad, pero nada se sabe sobre la variabilidad inducida.

El trabajo es pionero en este campo y los resultados muestran la validez del proceso desarrollado.

Capítulo 1



1. GENERALIDADES.

Para tener una idea clara acerca de las plantas atípicas, es necesario el conocimiento básico acerca de anatomía, cultivo de tejidos, variación somaclonal, caracterización de la variación somaclonal, los procesos correctivos, con estas herramientas, todo técnico y productor estará listo para poder tomar decisiones con respecto a su plantación de meristemas. Es por esto que la siguiente revisión bibliográfica pone de manifiesto todos los detalles que deben ser considerados.

1.1 Taxonomía y anatomía del banano.

Clasificación y distribución del banano.



Los bananos pertenecen al orden de las Zingiberales y a la familia Musaceae. Miembros de esta familia son largas hierbas de 2 a 9 metros de alto con un pseudotallo aéreo que consiste en hojas en forma de vainas compactadas que se desarrollan directamente del centro del corno (Lawrence, 1951; Purseglove, 1972).

Las Musaceas contienen solo dos géneros, *Musa* y *Ensete* (Simmonds, 1966; Copley & Steele, 1976).

El género *Musa* produce hijos y tiene pequeñas semillas (Copley & Steele, 1976; Samson, 1992). Existen 30 a 40 especies, todas las especies silvestres son diploides ($2n = 2x = 14, 18, 20, 22$) y nativas del sur este de Asia (Stover & Simmonds, 1987). El género *Musa* está dividido dentro de cinco series, basadas principalmente en el número básico de cromosomas, orientación y disposición de las flores en la inflorescencia. Las series son *Musa*, *Rhodochlamys*, *Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentimusa* (Argent, 1976; Simmonds and Weatherup, 1990). La Serie *Musa* es la más numerosa con 13 a 15

especies, la más diversificada y considerada la más antigua (Purseglove, 1972). Está distribuida extendiéndose desde el sur de India a Japón y Samoa (Purseglove, 1972). Las series *Musa* tienen el número básico (n) de cromosomas de 11 y una inflorescencia colgante o semicolgante (Cheesman, 1948; Simmonds, 1966). Esta serie incluye a los bananos propiamente dicho, a los de cocina y a los plátanos que se encuentran alrededor de los trópicos.

Las especies silvestres de las series *Musa* pueden reproducirse de forma sexual y asexual (a través de hijos que provienen del cormo). Alrededor de quince especies silvestres son *Musa acuminata* y *M. balbisiensis* algunas de las cuales han contribuido al origen de la mayoría de los bananos comestibles (Purseglove, 1972; Stover & Simmonds, 1987). Otras especies implicadas en la evolución de los cultivos es *M. schizocarpa* Simmonds.

M. schizocarpa puede estar involucrado en el origen de algunos de los diploides cultivados en Papua Nueva Guinea (Sharrock, 1990).

M. acuminata se origina en Malasia y es muy variable, contiene 7 a 8 subespecies. Cuatro de las subespecies provienen de la diversidad del centro de Malasia mientras otras forman poblaciones separadas

en islas lejos del área principal de distribución. Las cuatro subespecies son *ssp. malaccensis* Simmonds, *ssp. Microcarpa* Simmonds, *ssp. burmannica* Simmonds, and *ssp. siamea* Simmonds. Las otras cuatro subespecies son *ssp. banksii* (F. Muell.) Simmonds de Papua Nueva Guinea, esta es morfológicamente más distinta que todas las otras subespecies y en ocasiones tratada como una especie diferente. Por otra parte *Musa balbisiana* se origina de las zonas secas de la India y desde allí fué muy distribuida a Filipinas y Nueva Guinea pero ausente en Malasia. Esta es más resistente a sequías y enfermedades que *M. Acuminata* (Simmonds, 1966), pero no es variable como *M. acuminata*. Subespecies en *M. Balbisiana* no han sido descritas.

Evolución del cultivo de banano.

El primer y probablemente mas crucial paso en la evolución de los bananos comestibles fue el desarrollo y, subsecuentemente, la selección de plantas partenocárpicas y con semilla esteril en *Musa acuminata*, proveniente de cultivares comestibles diploides (AA). Las *M. acuminata* diploides con semillas tienen frutos que no son comestibles para los humanos pero pueden ser aprovechadas por pajaros, murciélagos y monos. Los bananos comestibles que

proviene de especies silvestres tienen la característica de producir frutos partenocárpicos, que no tienen semillas desarrolladas debido a que no necesitan que sus flores sean polinizadas. La fruta comestible pudo ser aprovechada gracias a la partenocarpia y a la esterilidad de la semilla.

Anatomía del banano.

Los bananos y plátanos son plantas herbáceas con pseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales o "hijos". Las hojas tienen una distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo (o cormo) dando origen al pseudotallo hasta alcanzar la superficie (Soto, 1992).

En la germinación de una semilla de *Musa* viable, la raíz primaria es muy pronto reemplazada por un sistema de raíces adventicias. El origen y desarrollo de las raíces adventicias es similar al de las raíces laterales; su origen es endógeno, se inician cerca de los tejidos vasculares y atraviesan todos los tejidos localizados fuera de su punto de origen. Este tipo de raíces puede generarse en los nudos

asociados con las yemas axilares o en forma independiente ; también puede desarrollarse en los entrenudos.

Los cormos en los bananos y plátanos comestibles son erectos.

Morfológicamente, el corno se define como un tallo que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias en la parte inferior o rizomorfo. Si un corno se corta longitudinalmente, el meristema apical se observa en una depresión encerrada entre las bases foliares circundantes.

En los bananos y plátanos comestibles hay un eje mayor dominante y las yemas laterales (retoños) se originan a cierta distancia del meristemo apical; estas características corresponden a un tallo de ramificación monopódica.

Los entrenudos son muy cortos por lo que el corno crece poco en altura; sin embargo, es grueso y carnoso debido a la gran cantidad de parénquima.

Las yemas laterales de *Musa* no se localizan en la posición clásica de las yemas laterales de otras plantas, sino a 156° de la posición

original, directamente encima de los márgenes de la hoja que la subtiende y están protegidas por una profla carnosa (primera hoja de un brote lateral) y varias hojas escuamiformes.

El cormo está constituido en su mayor parte por parénquima amiláceo. De acuerdo con Subra y Guillemot (1961), se pueden distinguir dos zonas: a) la externa o cortical, que en apariencia, desempeña un papel de protección y b) la parte central o activa de la cual salen el sistema aéreo, el sistema radical y los retoños.

Los brotes o retoños, mejor conocidos en los medios bananeros como "hijos", se desarrollan a partir de las yemas laterales del cormo. Al primer "hijo" se le llama "hijo axial" o puntual.

El sistema radical, en proceso de formación, puede tener un abundante número de raíces. El desarrollo del retoño puede sintetizarse en tres fases:

Fase infantil

Comprende el período desde la aparición de la yema lateral hasta la independencia de la planta madre.

Fase juvenil

Es el intervalo entre la independencia del hijo de la planta madre, la emisión de la primera hoja normal (Fm) y la diferenciación floral (DF).

Fase reproductiva

Es el lapso comprendido entre el inicio de la diferenciación floral y la cosecha del fruto.

La diferenciación floral se da en el momento cuando la planta se ha producido 15 hojas, y está cerca de Fm. En dicho momento la planta ha emitido todas la hojas, pero sólo han emergido la mitad.

Los plantadores de banano, acostumbran denominar algunos "hijos" con la siguiente nomenclatura:

- a) "Hijos de Espada" son aquéllos de buen desarrollo que se dejan durante la deshija. Estos hijos o chupones se desarrollan a partir del cormo y se diferenciar por ser muy vigorosos, esto es debido a que aprovechan los nutrientes de manera directa.
- b) "Hijos de Agua" son aquéllos de crecimiento pobre que se cortan durante la deshija. Por lo general estos chupones tienen una



conexión con el corno de la madre no directa lo cual no le permite un desarrollo vigoroso y este es obligado a desarrollarse con muchas deficiencias, sus hojas se engrosan de tal forma para poder aprovechar la luminosidad para todos los procesos de fotosíntesis y aprovechamiento de los nutrientes del suelo, a diferencia de los hijos de agua que no tienen necesidad de desarrollar sus hojas.

La hoja consta de base o vaina foliar, pseudopécíolos y láminas. Las hojas están distribuidas en forma espiral.

Aunque es escasa la información sobre el patrón filotáxico Soto (1998) afirma que "varía en los diferentes clones y especies. Las largas bases foliares se traslapan y forman un pseudotallo robusto, a través del cual crece la inflorescencia terminal. La lámina foliar está enrollada alrededor de la yema".

Las bases foliares son largas, sin lígulas y forman vainas envolventes que se traslapan a lo largo del pseudotallo. Los márgenes opuestos de cada base no se yuxtaponen. Las externas que fueron las primeras en originarse, son rechazadas y se desprenden debido a que el desarrollo de nuevas hojas en el interior del pseudotallo

produce un aumento de volumen (Iassoudière, 1978; Simmonds, 1973).

La vaina foliar tiene una epidermis glabra en ambas superficies y se adelgaza hacia los costados. Tiene numerosos espacios aeríferos o "alveolos" que se prolongan hasta la vena media de la lámina foliar y están atravesados por finos diafragmas perpendiculares a intervalos regulares, que forman espacios de 600 a 800 mm³ en la zona media de la vaina, que es la más gruesa.

La longitud del pseudotallo y su grueso están en relación directa en primer término con el tipo de clon y luego con el vigor de la planta resultado de su estado de crecimiento.

El pseudopecíolo en el extremo superior o distal de la vaina foliar se estrecha y se adelgaza hacia el limbo o lámina foliar. La cara cóncava (abaxial) de la vaina se hace más pronunciada y se "abarquilla" por crecimiento de los bordes, constituyendo un verdadero canal conductor de agua. Cada vaina es más larga que la anterior por lo que los pecíolos están regularmente escalonados. La separación entre los pecíolos se denomina en forma equivocada "entrenudos" ya que en realidad no lo son (Simmonds, 1973).

La lámina foliar es dorsiventral y glabra. Externamente, el limbo se observa como una lámina delgada, muy verde en su cara superior y más o menos glauca en la inferior. Está surcada por una nervadura estriada formada por las venas mayores que resaltan en la cara adaxial y están espaciadas de 5 a 10 mm; se extienden de la vena media hasta el margen casi perpendicular al eje, hay otras venas menores no tan definidas. La cutícula es irregular y varía en los diferentes clones.

La inflorescencia al salir no sigue la misma trayectoria vertical que trae, sino que en los clones comestibles la parte del raquis situada arriba de las hojas bracteales se curva hacia el suelo (Lassoudière, 1978 a,b).

Cuando el tallo floral, está totalmente formado se pueden distinguir varias zonas con características externas diferentes, las cuales se detallan a continuación:

- Una zona comprendida entre el cormo en su parte más ancha y la base de la primera bráctea vacía, es decir, sin glomérulos florales.

- Una parte que se extiende desde la primera bráctea vacía a la primera bráctea con un glomérulo de flores femeninas o pistiladas.
- Una tercera zona que empieza en la bráctea de la primera mano de flores pistiladas y termina en el ápice de la flor masculina (chira floral o toro). Esta última parte corresponde al tamaño de la inflorescencia que formará el racimo (Lassoudière, 1978d).

El desarrollo del fruto o banano es partenocárpico, esto es, sin polinización.

Gran parte de los clones de gran eficiencia, cultivados para la exportación, tienen una elevada esterilidad femenina inherente. Tal es el caso de los bananos del subgrupo "Cavendish", en el cual nunca se han logrado semillas mediante polinización experimental (Lassoudière, 1978d; Ram y Steward, 1962).

El número de dedos por mano y racimo, se da en el momento de la diferenciación floral. Mayor o menor número de dedos será consecuencia del desarrollo de la planta y de las condiciones ecológicas y de cultivo que imperen en períodos anteriores a esta diferenciación. El número de dedos por mano o por racimo, determina su tamaño y peso, en el momento de la cosecha.

1.2 Cultivo *in vitro*.

Propagación

La propagación de plantas consiste en efectuar su multiplicación por medios tanto sexuales como asexuales. Un estudio de la propagación de plantas presenta tres aspectos diferentes: Primero, para propagar las plantas con éxito es necesario conocer las manipulaciones mecánicas y procedimientos técnicos, cuyo dominio requiere cierta práctica y experiencia, siendo ejemplo de ello cómo hacer injertos o preparar estacas. Este aspecto puede considerarse como el arte de la propagación.

Segundo, el éxito en la propagación de plantas requiere del conocimiento de la estructura y la forma de desarrollo de la planta, lo cual puede decirse que constituye la ciencia de la propagación. El propagador puede obtener parte de esa información de manera empírica trabajando con las propias plantas, pero, si es posible, lo anterior debe ser complementado con cursos formales de estudio de botánica, horticultura, genética y fisiología vegetales.

Un tercer aspecto de la propagación exitosa de las plantas es el conocimiento de las distintas especies o clases de plantas y los varios métodos con los cuales es posible propagar ciertas de ellas. En gran parte, el método seleccionado debe estar en relación con las respuestas de la especie de planta que se propaga y la situación en que se efectúa.

Métodos de propagación de plantas con ejemplos típicos

I. Sexual

A. Propagación por semillas- muchas plantas anuales, bienales y perennes.

B. Sistemas de cultivo in vitro

1. Cultivo de óvulos
2. Cultivo de embriones
3. Cultivo de semillas
4. Polen
5. Esporas



II. Apomíctica (asexual)

A. Semillas

1. Embriones nucelares
2. Embrionía adeventicia

B. Sistemas de cultivo in vitro

1. Embriones nucelares

2. Embriogénesis de células y callo

III. Vegetativa (asexual)

A. Propagación por estacas

1. Estacas de tallo

- a. De madera dura
- b. De madera semidura
- c. De madera suave
- d. Herbáceas

2. Estacas de hojas

3. Estacas de hoja con yema

4. Estacas de raíz

B. Propagación por injerto

1. Injertos de raíz

2. Injertos de corona

3. Injertos de copa o aéreos

4. Injerto de aproximación

C. Propagación por yema

D. Propagación por acodado

E. Propagación por estolones

F. Propagación por hijuelos

G. Por separación

1. Bulbos

2. Cormos

- H. Por división

1. Rizomas
2. Hijuelos
3. Tubérculos
4. Raíces tuberosas
5. Coronas

- I. Sistemas de cultivo *in vitro*

1. Cultivo de puntas de ramas
2. Formación de brotes adventicios
3. Micro injerto
4. Cultivo de células y tejidos

Generalidades del cultivo *in vitro*

La connotación que las tecnologías de propagación *in vitro* tienen para la inducción de variación génica, obligan a tratar este tema con más detalle; así:

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quién

postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*.

Las herramientas necesarias que hicieron posible el avance de estas técnicas, tales como el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores de crecimiento, no estuvieron disponibles hasta finales de los años 50. A partir de ese momento se sucedieron una serie de acontecimientos como la regeneración de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert, 1958; Steward y col., 1958) y posteriormente la demostración de que estos embriones somáticos se originaban a partir de células aisladas (Bucks-Husemann y col., 1970; Reinert et al, 1971), los cuales confirmaron totalmente la capacidad de totipotencia de las células vegetales.

La más temprana aplicación de las técnicas *in vitro* en banano, fueron reportadas por Cox *et al.* (1960) quien cultivó embriones cigóticos exitosamente. Esta técnica fue desarrollada para corregir la errática y generalmente baja germinación de las semillas de banano. Ram *et al.* (1964) desarrolló varios clones mediante propagación *in vitro* de fruta partenocárpica. Aunque en la formación de callos, no se ha detectado formación de órganos (organogénesis). La primera propagación clonal in

vitro fue reportada por Ma and Shii (1972, 1974) en Taiwán. La alta incidencia de *Fusarium* (wilt) en algunos países ocasionó grandes pérdidas, incluso se tuvo que eliminar grandes áreas por lo que anualmente se tiene necesidad de usar materiales completamente limpios. Berg y Bustamante (1974) reportaron la erradicación del virus del mosaico del melón (CMV) en bananos provenientes de terapia de calor y cultivos de meristemas *in vitro*. Banana shoots irradiadas fueron cultivadas *in vitro* por De Guzman (1975) y De Guzman et al. (1976, 1980) para inducir mutación. Con estos fundamentos, mucha más información ha sido acumulada acerca del cultivo *in vitro* de *Musa* y el considerable potencial de este ha sido reconocido.

La producción comercial de bananos micropropagados es ahora establecida en algunos países y se estima que alrededor de 15 a 20 millones de plantas fueron producidas en 1991.

La micropropagación de bananos generalmente sigue las fases descritas por Murashige (1974). Después de esto, las plantas pasan a invernaderos de endurecimiento (aclimatación). En esta fase y de acuerdo a la variedad, las plantas son llevadas a cubetas de endurecimiento con un sustrato completamente estéril y constante aplicación de fertilizantes foliares, durante cuatro semanas

aproximadamente, después pasan a la fase dos que consiste en transplantar las plantas a fundas con sustrato completamente estéril y mantenerlas durante seis semanas hasta tener alrededor de 25 a 50 cm de altura, listas para pasar a fase de campo.

1.3 Cultivo de ápices y meristemas.

El cultivo aséptico de ápices y meristemas, la formación de una plántula y posteriormente la inducción de brotes axilares a partir de estas constituye la base de la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis (Hu y Wang, 1983; Vasil, 1994).

La técnica de cultivo de meristemas para la obtención de plantas libres de patógenos se fundamenta en el hecho de que la distribución de los microorganismos (virus, bacterias, micoplasmas) en los tejidos de la planta infectada no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo, por lo tanto, las posibilidades de que en las células del meristemo se encuentre menor número de partículas o estén libres de estas son mayores que en los tejidos más diferenciados de la planta. (Hernández, 1997).



El término "cultivo de meristemas" ha sido utilizado para designar a fragmentos de tejidos en un rango de 0.1 hasta 1 cm o más. Sin embargo, para el cultivo aséptico y el saneamiento este término implica el aislamiento del domo meristemático mas el primer primordio foliar en un rango de 0.1-0.5 mm (Hernández, 1997). A partir de este tamaño se considera cultivo de ápices.

Actualmente, en la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas bien definidas, cada una con sus objetivos específicos: Fase 0: Preparativa, Fase I: Establecimiento o Iniciación de los cultivos, Fase II: Multiplicación, Fase III: Enraizamiento y Fase IV: Aclimatación (Krikorian, 1991).

Fase preparativa

Inicialmente, esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la Fase I (Deberh y Maene, 1981). Sin embargo, en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

Selección de las plantas donantes

La iniciación de un proceso de micropropagación solo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta donante o planta madre es el primer factor relacionado con la frecuencia de variantes somaclonales resultante del proceso de propagación (Evans y Bravo, 1985). Por lo tanto, uno de los cuidados especiales que se deben tener al iniciar el proceso, es la selección del material de partida. Debiendo asegurarse de que el mismo provenga de una correcta selección individual.

Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas especiales que corresponden con el clon o variedad a propagar. A tales efectos, se establecen bancos de donantes para el proceso de micropropagación con individuos bien caracterizados tanto mediante los clasificadores morfológicos específicos como técnicas más modernas que implican el uso de marcadores bioquímicos o moleculares.

Por el propio desarrollo de los sistemas de propagación *in vitro*, especialmente en ornamentales, es común que la selección se realice

sobre plantas micropropagadas las cuales son cultivadas en condiciones controladas (invernaderos) ó áreas aisladas (bancos de donantes), lo cual evita una serie de riesgos, facilita la reimplantación *in vitro* y además mejora el proceso de selección.

Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo vigoroso y sano.

PRE-TRATAMIENTO A LAS PLANTAS DONANTES

La selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones higiénicas reduce notablemente los contaminantes, principalmente fungosos (Deberh y Maene, 1981).

Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debido a fallos en las técnicas o procedimientos (Cassells, 1991). Es por esta razón que siempre es más recomendable diagnosticar y tratar las plantas donantes, donde es mucho más fácil detectar los contaminantes en el tejido maduro ya que se pueden ver los síntomas o existen altas poblaciones del agente. Mientras que en el tejido *in vitro* prácticamente no se observan síntomas y las poblaciones son muy bajas, sobre todo en los primeros subcultivos.



Para disminuir los riesgos de contaminación en la implantación se han utilizado varios procedimientos tanto en campo como en invernadero, la aplicación de desinfectantes o mezclas de fungicidas y bactericidas en el material de plantación y su posterior trasplante en sustratos esterilizados y crecimiento en condiciones higiénicas. Adicionalmente también se han aplicado fungicidas, bactericidas e insecticidas, combinados o por separado, durante todo el ciclo de crecimiento de las plantas donadoras. A estas plantas se les realiza el diagnóstico a los principales microorganismos patógenos o contaminantes endógenos y a partir de esta información se pueden eliminar las contaminadas o colocarse bajo tratamiento.

Establecimiento o iniciación de los cultivos

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

EL EXPLANTE

El estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984).

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*.

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas (Villalobos y García, 1982).

Para fines de propagación comercial se emplean generalmente meristemas o ápices. Si el objetivo es la obtención de plantas libres de virus o enfermedades sistémicas es necesario partir de meristemas, pero

si por el contrario el objetivo es solamente la multiplicación de propágulos y no hay peligro de diseminación de enfermedades, se parte de plantas indexadas o diagnosticadas, usando ápices caulinares facilita los procesos.

MEDIOS DE CULTIVO Y HORMONAS DE CRECIMIENTO

Para el cultivo de meristemas y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuente utilizado, reportándose su utilización en la mayoría de las especies propagadas *in vitro* (Kantha, 1981).

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de tejido. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógena de hormonas.

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis, por lo general son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada. Hu y Wang (1983) reportan que en el 85% de los medios de establecimiento se utilizan citoquininas, las más empleadas han sido la 6 Benzilaminopurina (6 BAP) (68%), la kinetina (23%) y el 2ip y zeatina (9%).

Algo contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de germinación activa son los ápices y meristemos empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, siendo estas áreas centros de síntesis de auxinas, la concentración endógena de las mismas es alta en ellos (Vázquez y Torres, 1980; Hu y Wang, 1983).

Normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemos de 0.4 mm o menos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición exógena en estos casos.

Las giberelinas aunque su efecto es diferente a las auxinas, han sido adicionadas sólo en el 17% de los casos, al parecer en la mayoría de los



explantes se sintetiza suficiente cantidad de estas hormonas (Hu y Wang, 1983).

OXIDACIÓN FENÓLICA

Las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte. Este fenómeno es más agudo en las especies leñosas, aunque es reportado en un amplio rango de vegetales, constituyendo en múltiples ocasiones una dificultad para el establecimiento de los cultivos *in vitro*.

Cuando los tejidos son dañados, por ejemplo durante la preparación del explante, los compuestos fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas y aparece la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación (Preece y Compton, 1991). Estos compuestos oxidados son

altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática (Hu y Wang, 1983), lo cual puede resultar en un oscurecimiento letal de los explantes.

Los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Estos productos oxidados pueden ser fitotóxicos y a la vez pueden incrementar los procesos de oxidación, debido a que después de oxidados se convierten en fuertes agentes oxidantes.

Las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica se pueden resumir de la siguiente forma:

- Enjuagues en soluciones antioxidantes previo posterior a la disección de los explantes.
- Adición de antioxidantes al medio de cultivo (inhibidores de la polifenoloxidasa o absorbentes)
- Cambios frecuentes del explante a otro medio nuevo de cultivo: Cada vez que se observe fenolización o con frecuencia regular).
- Disminución de la intensidad luminosa o cultivo en la oscuridad en las etapas iniciales.

- Empleo de medios líquidos en sustitución de medios gelificados o adicionar una capa fina de medio líquido en la superficie del medio sólido para diluir metabolitos tóxicos.
- Modificación del pH y del potencial redox del medio (agentes reductores).
- Cambios en el nivel de sacarosa del medio.
- Regulación de la temperatura (evitar altas temperaturas en la cámara de cultivo y durante la transferencia de los explantes).

Los antioxidantes más empleados han sido:

- Ácido ascórbico
- Polivinilpirolidona (PVP).
- L-cisteína.
- Dithiotreitol
- Ácido cítrico
- Tiourea
- Carbón activado.

La adición de compuestos naturales como el agua de coco y la albúmina de suero bovino han sido beneficiosas para reducir las oxidaciones fenólicas.

Fase III: Enraizamiento

Se caracteriza por ser la fase más voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que, además de crecer y desarrollar unseudotallo o tallo con las primeras hojas forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una vitroplanta aclimatizada lista para llevarse al campo.

Si no se logra una uniformidad en la calidad de la vitroplanta que se produce *in vitro*, ello creará problemas no sólo en el desarrollo durante la aclimatización, sino en el rechazo que tiene el producto en su comercialización, ya sea que se comercialice en la Fase III o como vitroplanta ya lista para trasplante a campo (Fase IV). Por otra parte, las diferencias en desarrollo pueden crear confusión sobre si el material

vegetal presenta problemas con variabilidad de tipo epigenética o genética.

Para lograr la mayor eficiencia biológica, económica y productiva, en esta Fase, durante el proceso *in vitro*, varios factores deben manejarse adecuada y armónicamente, entre ellos: medios de cultivo simples y de ser posible en estado líquido, uso de componentes del medio con sustancias químicas de calidad técnica, luz natural como fuente de iluminación, frascos de cultivo con dimensiones adecuadas para la especie que se produce, disminuir al mínimo los riesgos de contaminación, entre otros. Las experiencias acumuladas en el uso y manejo de estos factores se discuten a continuación.

MEDIOS DE CULTIVO Y COMPONENTES

Existen tres estados de desarrollo involucrados en la rizogénesis: a) inducción, b) iniciación y c) elongación. Ya que es bastante difícil separar los estados a y b, generalmente estos se combinan en el estado de iniciación (Hu y Wang, 1983).

Reguladores de crecimiento

Normalmente para la inducción de enraizamiento no es necesaria la adición de citoquininas al medio de cultivo, siendo estas sustituidas por algunas auxinas.

Es bien conocido desde los trabajos clásicos de Skoog y Miller (1958), que la iniciación de raíces adventicias "de novo" depende de una correlación entre la concentración de auxinas y citoquininas en el medio, correspondiendo los niveles más altos para las auxinas. Kuo y Tsay (1977), demostraron que la relación citoquinina/auxina debía ser > 1 para un buen crecimiento de los brotes, mientras que cuando esta relación es < 1 , se produce la diferenciación de raíces. Debido al efecto residual de las citoquininas adicionadas al medio de cultivo durante la multiplicación, en algunas especies se presenta un efecto inhibitorio en la formación de raíces (Sauvaire y Galzy, 1981). A veces este efecto es tan grande que se hace necesario transferir los brotes durante dos subcultivos continuados en medios de enraizamiento, lográndose en el primero de ellos una elongación de las vitroplantas y el desarrollo de nuevos brotes que dan lugar a un mayor número de vitroplantas en el siguiente subcultivo. Esto es más notorio en aquellos casos donde se emplean altas dosis de citoquininas en el último subcultivo durante la multiplicación.

El rol de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido (Vásquez y Torres, 1981), recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento, excepto en aquellas especies donde su empleo no es necesario, limitándose a la utilización en estos casos de medios básicos simples sin ningún regulador de crecimiento. Las auxinas más usadas en esta fase son el ácido naftalen acético (ANA), ácido indol butírico (AIB), ácido indol acético (AIA) y el (2,4 diclorofenoxiacético) 2,4-D en el 53%, 29%, 11% y 3.6% de los medios de cultivo respectivamente, (Hu y Wang, 1983). Para muchas especies de plantas se ha demostrado que la auxina más importante para la inducción de raíces es el ANA (Kitto y Youg, 1981; Johnson, 1978). Sin embargo, ya que los brotes jóvenes en desarrollo son una rica fuente en la producción de auxinas, la adición de estas a los medios de cultivo durante esta fase, se ha encontrado que es innecesaria para muchas especies (Orellana, 1995). Otro procedimiento empleado, no muy utilizado, es la sumersión durante varios minutos de los brotes en una solución con altas concentraciones de auxinas y transferidos a un medio libre de estas.

Para la micropropagación de plátanos y bananos normalmente se utilizan niveles de auxina (AIA) de 1-2 mg/L en el medio de enraizamiento,

aunque Cronauer y Krikorian (1984), encontraron igual respuesta con ANA; AIA y AIB, sin añadir citoquininas, con brotes no menores de 15 mm y preferiblemente con una o dos hojas enrolladas. Con estas condiciones, en algunos clones las raíces aparecieron después de los seis días, sin embargo, en otros se prolongó hasta cuatro semanas (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Drew y Smith (1990), lograron el enraizamiento en la variedad de bananos New Guinea Cavendish sin la adición de auxina al medio de cultivo, al igual que Sandoval y col., (1991) en clones con genoma AAA, AAB y ABB.

Concentración de sales minerales

El manejo de la concentración de las sales minerales es recomendado ampliamente para estimular el enraizamiento, (Murashige, 1982), lográndose la formación abundante de raíces al disminuir las sales a la mitad, un tercio o un cuarto de la concentración de los medios (HU y Wang, 1983). Sin embargo el procedimiento más empleado es la reducción de las sales a la mitad de su concentración (Maretzki e Hiraki, 1980), ya que su disminución mayor pudiera afectar el desarrollo general de la vitroplanta.

Concentración de sacarosa

En la mayoría de los medios de cultivo para enraizamiento se recomienda elevar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. En caña de azúcar se observa un abundante enraizamiento en medios que contengan entre 5 y 9 % de sacarosa (Maretzi e Hiraki, 1980; Ballester y González, 1983).

Estado físico del medio de cultivo

Aunque en la mayoría de los medios de enraizamiento se emplea el agar como soporte, al no ser este un material completamente inerte, se ha reportado un crecimiento pobre de las raíces en varias especies sensitivas (Lane, 1979), explicándose este fenómeno por la poca difusión de sustancias tóxicas liberadas por el tejido en crecimiento, la poca aireación y la menor absorción de nutrientes.

Los medios de cultivo líquidos ofrecen ventajas en esta fase ya que además de las otras facilidades que poseen, permiten la difusión de los residuos tóxicos de las vitroplantas, fundamentalmente los fenoles que son abundantes durante la iniciación del crecimiento de las raíces. El desarrollo general de la vitroplanta es más rápido acortándose el período para ser llevada a la fase de aclimatización. Las vitroplantas en medio de



enraizamiento líquido fueron superiores significativamente a las subcultivadas en medios semisólidos en altura, número y longitud de las raíces (Jiménez, 1995).

En bananos de un 20% a un 35% de los brotes son enraizados en medios líquidos cuando un lote completo es destinado para que pase a esta fase. Algunas variedades como Williams híbrido son menos sensibles a la inmersión lo que posibilita que este por ciento sea mayor.

Efecto de la propagación vía organogénesis en la variabilidad

La inestabilidad genética es otro problema asociado con la industria de la micropropagación. En ciertos cultivos (clones del género *Musa*, *Asparagus officinalis*, *Brassica oleraceae*, *Nicotiana tabacum*, *Oriza sativa*, *Saccharum spp.* y otros; (Murashige, 1974; Orellana, 1995) el proceso propicia el incremento de la frecuencia de variación, lo que puede ser particularmente desventajoso cuando el cambio es una reversión a una forma menos deseable. Esto causó problemas a compañías y laboratorios dedicados a la micropropagación de bananos que en la década de los 80 comercializaron vitroplantas con altos índices de variabilidad, llegando en algunos casos a más de 30% de vitroplantas atípicas. A pesar de esta desventaja en la micropropagación comercial, los investigadores han descubierto que los procesos que involucran

cambios genéticos son útiles para la mejora en algunas especies. No obstante lo anterior, la investigación y la experiencia acumulada en por más de 20 años en la micropropagación de especies con alto riesgo de variabilidad como lo es, sin duda el caso de varios clones del género *Musa*, ha permitido conocer y manejar los factores, tanto de la especie en cuestión como del proceso *in vitro*, que posibilitan hoy una alta estabilidad genética en las plantas micropropagadas y el descarte en fases tempranas de las variantes indeseables durante las diferentes etapas de desarrollo, llegando al campo un bajo por ciento de vitroplantas con cambios, aunque algunos de estos cambios o modificaciones sólo pueden detectarse en plantas adultas o en la cosecha.

1.4 Variación somaclonal.

Con el surgimiento de las técnicas biotecnológicas, que permiten manejar *in vitro* órganos, tejidos y células, surge una amplia perspectiva de estas técnicas tanto para la producción de semillas como para el mejoramiento genético. Ambos objetivos tienen en contraposición que para la producción de semillas se requiere la máxima estabilidad genética, y en el caso del mejoramiento genético este se basa solamente en los cambios que transforman el material hereditario.

En los últimos años se han realizado muchas investigaciones sobre las técnicas de la biotecnología agrícola y en su empleo práctico, existiendo discrepancias y contradicciones en muchas publicaciones. En algunos casos se ha sobrestimado la variabilidad y esto ha traído como consecuencia resultados inferiores a los esperados en el mejoramiento genético.

La ocurrencia de plantas de banano atípicas propagadas *in vitro* han sido reportadas en diferentes partes del mundo.

La frecuencia de plantas de banano atípicas han sido reportadas desde muy altas con un 50% (Daniells, 1988) y 25% (Stover, 1987) a bajas con un 3% (Hwang and Ko, 1987) y 1% (Arias and Valverde, 1987). En plátano (tabla 2) también se han reportado variables (sandoval *et al.*, 1991, Vuylsteke *et al.*, 1990). La aparición de este tipo de plantas es, por consiguiente, un fenómeno común en bananos y plátanos.

Las plantas atípicas pueden diferir permanentemente o de manera temporal su fenotipo, frente a la planta utilizada como fuente. La última es un resultado de un efecto epigenético o fisiológico, se caracterizan por no tener cambios hereditarios y son reversibles. El concepto de cambio

epigenético surge con el desarrollo del cultivo *in vitro* y ha sido una causa fundamental de la sobre estimación de la variabilidad genética producida por el cultivo *in vitro*. Como cambios epigenéticos se denominan los cambios fenotípicos que son generados por genes que son estimulados y se expresan por los efectos del cultivo *in vitro* per se, pero estos genes no presentan cambios en el material hereditario (J Pérez, 1998). Las plantas atípicas que son permanentes son referidas como variantes somaclonales, estas muestran características que son heredadas y entre estas tenemos, una pre-existente en las plantas fuente debido a la variación *de novo* vía mecanismos indeterminados genéticamente (Larkin and Scowcroft, 1981), conocida también como deriva natural; la otra resulta ser inducida por agentes externos. Se conoce muy poco sobre las causas de variación somaclonal en bananos (Reuveni and Israeli, 1990; Reuveni *et al.*, 1992) y la identificación de una planta atípica como una variante somaclonal requiere observaciones sobre algunos ciclos de retorno (Scowcroft, 1984)

El hecho que el porcentaje de variación en banano y plátano podría ser muy alto es, por consiguiente, una muy crítica consideración para la propagación *in vitro* y la conservación de germoplasma, donde el mantenimiento de la estabilidad genética es lo más importante. Una

descripción de las más comunes variantes, su temprana detección, las medidas para reducir sus posibles causas serán descritas a continuación.

Descripción y ocurrencia de variantes.

Variación en talla.

El enanismo, es la variación más común en el sub-grupo "Cavendish"; por ejemplo se han reportado que alrededor del 75% (Stover, 1987) y 90% (Israeli and Nameri, 1985) del total de variantes resultaron enanas. De hecho, el rango entero de variación de estatura conocida en este grupo (Stover, 1988) puede encontrarse simultáneamente. Varios cultivares son caracterizados por variaciones típicas de estatura. Así, en Williams y Gran enano la más común fuera de tipo es muy similar a "Cavendish enano" mientras en la selección Israeli, "Nathan" (derivada de Cavendish enano), la más común variante es una extra-enana variante (Israeli *et al.*, 1991) Gigantismo y formas intermedias en estatura fueron encontradas algunas veces y, en un caso, "Valery" como variantes fueron las más frecuentes en plantas in vitro de "Gran enano" (Arias and Valverde, 1987).



Variación en follaje.

El más común fuera de tipo en este grupo es el tipo mosaico, caracterizado por hojas de mucho espesor, elásticas y delgadas, con diferentes grados de color pálido verde moteado, pareciendo una infección por virus ante los ojos de inexpertos (Israeli et al., 1991).

Otras variaciones del follaje incluyen hojas variegadas, cambios en coloración (roja, verde pálido, negro) de pecíolos y algunas variaciones en la lámina, tal como manchas negras, dorado, lámina deforme y hojas erectas (Daniels and Smith, 1991; Israeli et al., 1991; Smith, 1988).

Variación en color y morfología del pseudotallo.

Cada variación en estatura es asociada con cambios morfológicos de el pseudotallo, en tamaño, circunferencia y espacio entre pecíolos.

Sin embargo, hay además variaciones específicas del pseudotallo. Un muy delgado pseudotallo fue reportado por Daniells y Smith (1991). Cambios de color involucrando varios grados, desde negro, rojizo, verde pálido y rayas café han sido reportadas (Daniels and Smith, 1991; Israeli

et al., 1991). El cambio en el color del pseudotallo es generalmente asociado con el cambio de color de los pecíolos.

Variación en frutos e inflorescencia.

Cambios en estatura y follaje son asociados con las variaciones en la morfología del racimo, coloración y morfología del fruto. Aparte de esto, hay racimos fuera de tipo específicos con pedúnculos muy largos, dedos largos o cortos, frutos pubescentes (Smith, 1988), racimos con flores masculinas (Stover, 1987), flores persistentes y dedos con rajaduras (Israeli *et al.*, 1991), cambios en el color de las brácteas y en la forma y color del toro han sido reportados (Daniells and Smith, 1991; Stover, 1987).

Detección temprana de variantes somaclonales.

Un alto porcentaje de variación somaclonal podría limitar el uso de las técnicas *in vitro* para la propagación de banano en operaciones comerciales de gran escala. Stover (1987) estableció que no menos del 5% de plantas fuera de tipo es un rango comercialmente aceptable. Una de las vías para lograr un bajo porcentaje es la detección y eliminación temprana de las variantes somaclonales, mientras más temprano se

realice esta actividad, menor será la pérdida del propagador y del agricultor. Algunas plantas fuera de tipo pueden ser detectados fenotípicamente en el laboratorio o en la fase de aclimatación.

Desafortunadamente, las variantes más comunes, enanas y tipo mosaico, son detectadas durante el final de la fase de invernadero (Israeli *et al.*, 1991; Smith and Hamill, 1991). Las variaciones enanas son detectadas más fácilmente en "Williams" que en "Gran enano", caracterizadas por su corta estatura, pequeña distancia entre pecíolos, corta longitud del pecíolo y diferente forma de la lámina. Cote *et al.* (1992) ha sugerido la posibilidad de la detección de las enanas en la aclimatación. Esta podría ser una importante mejora si prueba ser eficiente.

En algunos cultivares de banano es posible detectar enanismo en los frascos añadiendo GA3 al medio de cultivo. Las plantas normales responden con una rápida elongación y reducción de la producción de hojas, mientras que las variantes enanas son mucho más lentas en responder (Reuveni, 1989). El uso de este método como un medio selectivo es valorado donde es muy crucialmente importante detectar plantas fuera de tipo como en intercambio de germoplasma y conservación. Sin embargo, esta técnica no parece ser aplicable a operaciones comerciales porque tiene un costo adicional. En un estudio

preliminar varios primers de RAPD y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron aplicados para obtener bandas de ADN polimórfico, así se han obtenido fingerprints de bananos normales y enanos (Shoseyov and Reuveni, unpublished). En el presente, existen trabajadores entrenados para detectar variantes en la fase de aclimatación.

Factores envueltos en las variaciones somaclonales.

Algunas fuentes o mecanismos por los que se obtienen cambios genéticos en cultivo *in vitro* han sido propuestas (Swartz, 1991). Solo aquellas que son relevantes para *Musa* están consideradas a continuación:

- Variaciones *in vitro* versus variaciones *in vivo*

- Efecto del genotipo

- Fuente y tipo de explante

- Tipo de brote

- Composición del medio de cultivo

- Duración en el cultivo

Variaciones *in vitro* versus variaciones *in vivo*.

El porcentaje de variantes expresadas fenotípicamente es relativamente estrecho tanto en banano (Israeli *et al.*, 1991) y plátano (Vuylsteke *et al.*, 1991). La mayoría de las variantes también pueden ocurrir *in vivo*. El porcentaje de variación *in vivo* en el sub-grupo Cavendish es mínimo, en millones de plantas (Discusión de Israeli *et al.*, 1991) mientras que en plátanos, el número de variantes es mayor (Sandoval *et al.*, 1991b; Vuylsteke *et al.*, 1988). La variabilidad *in vitro* esta sobre porcentajes similares en bananos y plátanos (tabla 1 y tabla 2), ahora, si comparamos el porcentaje calculado entre variantes *in vitro* versus variantes *in vivo* es más alto en banano que en plátano.

Efecto del genotipo.

Tanto en banano como en plátano, el tipo de porcentaje de variación es específico al genotipo (Israeli *et al.*, 1991; Smith, 1988; Stover, 1987; Vuylsteke *et al.*, 1991). Esto es verdad no solamente para diferentes cultivares pero además para diferentes selecciones en un mismo cultivar.

Reuveni e Israeli (1990) sugirieron la posibilidad de seleccionar familias estables, cada una de las cuales podrían ser derivadas de una planta individual de la variedad Williams (AAA), plantas obtenidas en el campo mediante un método aleatorio. El número de plantas regeneradas por cada línea en la fase de screening fue relativamente bajo. Sin embargo, por multiplicación de algunas familias seleccionadas, una familia estable fue obtenida. En esta familia, solamente tres plantas enanas fueron encontradas de alrededor de 12500 plantas regeneradas. Otras variaciones en esta familia (0.5%) fueron tipo mosaico, hojas variegadas y pseudotallo rojo. Este estudio demostró la importancia del perfil genético de la planta base. Los diferentes porcentajes de la variación somaclonal reportados en la literatura podrían ser explicados, parcialmente, por el uso de material variado siempre que este provenga del mismo cultivar, lo que hace más alta la probabilidad de tener ratios altos de variación somaclonal.

Fuente y tipo de explante.

Generalmente, es aceptado que la variación se reduce si es usado un material primario más organizado (Scowcroft, 1984). Plantas que provienen de brotes se espera que varíen menos que las obtenidas de callos, como se reportó por parte de Drew y Smith (1990). Cuando se

usan ápices florales como explantes primarios, un alto rango de variación fue encontrado y comparado con la fuente de brotes (Smith, 1988). Los resultados de Bakry et al. (1990); Lahav, Israeli y Reuveni (1995) no confirman una diferencia en variación resultando desde uso de uno u otro de los dos tipos de explantes primarios.

Tipo de brote.

El tipo de brote y proliferación de propágulos de *Musa in vitro* podrían ser un importante factor para la ocurrencia de variación somaclonal. Plantas regeneradas desde brotes auxiliares son consideradas, quizá menos probables de tener variación somaclonal que aquellas que provienen de meristemas adventicios (Scowcroft, 1984). Básicamente, dos tipos de brotes son observados en cultivos *in vitro* de pequeños brotes de *Musa*. Uno es por el desarrollo de un solo eje totalmente largo, desarrollado, desde explantes cortados longitudinalmente. El otro tipo está caracterizado por la formación de agrupaciones de pequeños brotes o grupos de pequeñas estructuras como diminutos bulbos conectados al explante subcultivado. Este tipo de proliferación ocurre cuando existen altas concentraciones de BAP en el medio. La formación adventicia *De novo* fue encontrada por Banerjee et al. (1986) en plátano Bluggoe. Aparece, por consiguiente que, algunos brotes provenientes de explantes



subcultivados son también adventicios. Reuveni et al. (1992) reportaron que plantas de variedad Williams regeneradas *in vitro* cultivadas en diferentes medios, tuvieron un alto porcentaje de variantes enanas comparadas con aquellas regeneradas de partes no adventicias del mismo cultivar sobre las mismas condiciones de cultivo.

TABLA 1

INCIDENCIA Y VARIANTES ATÍPICAS, REPORTADAS DE BANANOS (AAA) PROPAGADOS IN VITRO

Cultivar	Incidencia %	Variante promedio	Referencia
Red	8.6-16.0	Verde-roja	Israeli, 1985
Williams	0-8.4	Enana	Reuveni et al., 1986
Cavendish gigante	3.0	Enana	Hwang and Ko, 1987
Gran enano	5.0-19.0	Enana	Pool and Irizarry, 1987
Red	10.0-20.0	Verde-rojo	Epp, 1987
Gran enano	1.1	Gigante	Arias y Valverde, 1987
Gran enano	25.0	Enana	Stover, 1987
Williams	2.4-18.6	Verde-rojo	Israeli et al., 1988
Nathan	1.4-12.3	Extra enana	Israeli et al., 1988
Williams	8.0-11.0	Enana	Johns, 1988
Mons Mari	2.0-39.0	Enana	Johns, 1988
Williams	50.0	Enana	Daniells, 1988
Williams	4.1-31.7	Enana	Smith, 1988
Gran enano	7.2-29.2	Enana	Reuveni e Israeli, 1990
Williams	1.7-4.2	Enana	Israeli, no publicado
Gran enano	2.0-7.3	Enana	Israeli, no publicado
Gran enano	3.0-63.3	Enana	Carrieres, 1991

TABLA 2

INCIDENCIA Y VARIANTES ATÍPICAS, REPORTADAS DE PLÁTANOS (AAB) PROPAGADOS IN VITRO

Cultivar	Incidencia %	Variante promedio	Referencia
Maricongo	21.0	Plátano Frances alto	Ramcharan et al., 1987
Horn enano	38.0	Plátano Francés enano	Ramcharan et al., 1987
Bobby Tannap	0	-----	Vuylsteke et al, 1991
Ntange 2	0.5	Estatura planta	Vuylsteke et al, 1991
Obino l'Ewai	2.1	Reversión a Francés	Vuylsteke et al, 1991
Agbagba(4)	4.4	Reversión a Francés	Vuylsteke et al, 1991
Ubok Iba	12.5	Pecíolo verde	Vuylsteke et al, 1991
Big Ebanga	35.0	Reversión a Francés	Vuylsteke et al, 1991
Bise Egome 2	69.1	Pecíolo verde	Vuylsteke et al, 1991
Falso cuerno (5)	10.8	Enana	Sandoval et al., 1991b
Saba	0	-----	Stover, 1987

Composición del medio de cultivo.

Variaciones en los componentes y concentraciones del medio comúnmente usados para multiplicaciones *in vitro* no afectaron

directamente la proporción de variantes (Reuveni et al., 1992). Cuando se utilizan elevados niveles de citoquininas en el medio, estas inducen la formación de meristemas adventicios, el principal efecto fue alteración del genotipo.

Duración en el cultivo.

La opinión general es que incrementando el número de subcultivos y la duración entre ellos refuerza la proporción de variaciones somaclonales (Swartz, 1991). Cuando una alta proporción de proliferación es lograda (como en el caso de la multiplicación *in vitro*), el periodo entre subcultivos es corto y más subcultivos son realizados en un tiempo determinado. Generalmente, cada uno de los explantes subcultivados son separados e inducidos para formar nuevas generaciones de plantas. Sin embargo, después de varios subcultivos el número de plantas obtenido es variable dependiendo de los intervalos de subcultivos y la proporción de la proliferación de los mismos. En el caso de banano, ha sido encontrado que manteniendo periodos constantes de tiempo entre subcultivos, la proporción de variación somaclonal se ve incrementado con el número de generación (Reuveni e Israeli, 1990).

1.5 Caracterización morfológica.

Debido a que el sistema de cultivo *in vitro* es usado en la micropropagación como en el mejoramiento genético de Musa, estos métodos pueden no garantizar la uniformidad clonal del material producido, debido a que pueden aparecer mutaciones y variaciones genéticas. El término mutación se utiliza para describir un cambio en el genoma que se transmite meióticamente, de acuerdo con las leyes de la herencia; cuando no se conoce la naturaleza del cambio heredable se utiliza el término de variación (Meins, 1983; citado por Pierik, 1990). El término variación somaclonal se aplica a la variación que se origina en plantas producidas *in vitro* (Larkin y Scowcroft, 1981). Las plantas que presentan este fenómeno han sido denominadas con diferentes nombres, por ejemplo: "fuera de tipo", "off-type", "subclones", "mutantes", "vitro-variantes", "variantes"; entre otros.

Además de la variación somaclonal, diversos autores utilizan el término variación epigenética para referirse a los cambios en la expresión genética inducidas por las condiciones del medio, es una variación no heredable de acuerdo con las leyes de Mendel, es reversible y relacionada principalmente con rasgos cuantitativos y hábitos de crecimientos (Demarly, 1986).

Pierik (1990) indica algunos ejemplos de variación epigenética:

1. En el caso de propagación *in vitro* existe la posibilidad de obtener plantas libres de virus, bien por el cultivo de meristemos o por la formación de vástagos adventicios. Las plantas libres de virus pueden ser completamente diferentes en su aspecto externo de las plantas que contienen virus.
2. Se pueden obtener diferentes fenotipos como consecuencia de la utilización de citokininas o auxinas (un elevado grado de ramificación, fasciación, engrosamiento, etc.); estos cambios no suponen la existencia de mutaciones, aunque si tienen su apariencia.
3. Las plantas pueden presentar un aspecto anormal, como resultado de la enfermedad fisiológica denominada vitrificación.
4. Las plantas pueden sufrir cambios (por ejemplo, en el número y morfología de los estomas, o en la composición de las ceras cuticulares), debido al ambiente que se produce en condiciones *in vitro* (por ejemplo, una elevada humedad relativa).



A pesar de los estudios realizados con el propósito de conocer mejor estos fenómenos de variación *in vitro* (Krikorian, 1985; Demarly, 1986; Pierik, 1990) existen controversias entre los diversos autores sobre el uso de estas terminologías, debido posiblemente a que sus causas no están bien definidas.

Los tipos de variantes somaclonales encontrados en *Musa* son:

- Enanismo
- Gigantismo o porte alto.
- Filotaxia anormal
- Mosaico
- Variegación
- Masada
- Coloración atípica del pseudotallo
- Lámina foliar anormal
- Pecíolo alado
- Reversión a "Valery" en "Gran enano"
- Tipo plátano en banano (*Musa AAA*)
- Persistencia de flores (en variedades dehiscentes)
- Malformación de flores
- Solo flores masculinas

- Racimo anormal
- Dedos deformes
- Rajadura de dedos
- Resistencia a *Fusarium oxisporium* f. sp. Cubense

Plantas atípicas más comunes.

La variación que se presenta de manera muy común en cultivos provenientes de condiciones *in vitro* en Cavendish es la enana. Estas plantas son caracterizadas por tener pequeña altura, pecíolos cortos, longitud de la hoja muy pequeña, retención de flores y brácteas.

Variaciones en coloración del pseudotallo son comunes. Las variaciones pueden ser desde verde a rosado o negro. Usualmente los frutos de esta variante suelen ser comercialmente aceptables.

Las variantes del mosaico en las hojas también ocurren regularmente. Estas se caracterizan por hojas muy angostas y alargadas con manchas claras y oscuras en la lámina. Los frutos de esta variante tienden a ser más pequeños que lo normal.

1.6 Procesos correctivos.

Basado sobre los factores mencionados anteriormente las siguientes medidas deben ser tomadas:

1. La planta fuente debe contener completamente las descripciones conocidas del cultivar, debe tener las características agronómicas deseadas y las características de un clon el cual es relativamente estable en propagación *in vitro*.
2. El número de plantas (y obviamente además del número de generaciones) producidas desde un explante primario debe ser reducido.
3. Algunos explantes primarios por lote deben ser usados, para minimizar el riesgo de tener un alto porcentaje de variantes obtenidos de un solo explante que pudo haber mutado en una fase temprana de propagación.
4. Evitar demasiados pases de un medio a otro nuevo superior a 5.



5. Un pequeño desarrollo en la siembra de cada subcultivo podría ser eliminado y no usado para nuevas generaciones.
6. Plantas atípicas pueden ser detectadas y eliminadas en cada una de los estadios hasta la fase de aclimatación.

Capítulo 2

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BANANO CULTIVADO *IN VITRO*.

2.1 Descriptores.

DEFINICIONES Y USO DE LOS DESCRIPTORES

Actualmente el IPGRI utiliza las siguientes definiciones en la documentación de recursos fitogenéticos:

Descriptores de **pasaporte**: proporcionan la información básica que se utiliza para el manejo general de la variedad introducida o también llamada *accesión* y describe los parámetros que se deberían observar cuando se recolecta originalmente la misma (incluyendo el registro en el banco de germoplasma y cualquier otra información de identificación).

Descriptores de **manejo**: proporcionan las bases para el manejo de accesiones en el banco de germoplasma y ayudan durante su multiplicación/regeneración.

Descriptores del **sitio y medio ambiente**: describen los parámetros específicos del sitio y ambientales que son importantes cuando se realizan pruebas de caracterización y evaluación.

Pueden ser importantes para la interpretación de los resultados de esos procesos. Se incluyen también en esta categoría los descriptores del sitio de recolección de germoplasma.

Descriptores de **caracterización**: permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos.

Generalmente son caracteres altamente heredables, pueden ser fácilmente detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además, pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales que son deseables según el consenso de los usuarios de un cultivo en particular.

Descriptores de **evaluación**: muchos de los descriptores de esta categoría son susceptibles a las diferencias ambientales, pero son generalmente útiles en la mejora de un cultivo y otros pueden involucrar la caracterización bioquímica o molecular. Ellos incluyen rendimiento, productividad agronómica, susceptibilidad al estrés y caracteres bioquímicos y citológicos.

La caracterización es generalmente responsabilidad de los conservadores de las colecciones, mientras que la evaluación debería ser hecha en otra parte (posiblemente, por un equipo multidisciplinario de científicos). Los datos de evaluación deben ser enviados al banco de germoplasma donde se mantendrá un archivo de datos.

Las normas aceptadas internacionalmente para la toma de datos, codificación y registro de los estados de los descriptores son las siguientes:

a) Se utiliza el sistema SI de unidades (Système International d'Unités).

Las unidades a aplicarse están dadas entre corchetes al lado del nombre del descriptor;

b) se recomienda con énfasis el uso de tablas estándares de color para todos los caracteres de color, tales como Royal Horticultural Society Colour Chart, Methuen Handbook of Colour, o Munsell Color Charts for Plant Tissues, (la tabla que se utilice deberá especificarse en la sección donde se utiliza);

2.2 Lista seleccionada para la caracterización de la variación somaclonal en *Musa acuminata*, grupo Cavendish, variedad Williams.

En el presente trabajo se han seleccionado los descriptores de caracterización para poder generar una información que nos permita identificar estas variaciones en el campo.

Se proveen dos tablas de colores (A y B) para ayudar en las decisiones sobre el color.

La lista seleccionada es:



Apariencia general de la planta

Hábito foliar: 1 Erecto; 2 Normal; 3 Decumbente; 4 Otro (por ej. 'muy decumbente', especificar en el descriptor **Notas, 6.8**)

Enanismo: 1 Sin alteración de la filotaxia (las hojas no se superponen); 2 Con alteración de la filotaxia (las hojas se recubren fuertemente)

Pseudotallo

Altura del pseudotallo [m]

Medida desde la base del pseudotallo hasta el punto de emergencia del pedúnculo

1 ≤ 2 ; 2 2.1 a 2.9; 3 ≥ 3

Color del pseudotallo

Observar el color general del pseudotallo, sin quitar la vaina externa pero sin

considerar las viejas vainas desgarradas. (Tabla A)

1 Verde amarillo; 2 Verde medio; 3 Verde; 4 Verde oscuro; 5 Verde rojizo; 6 Rojo; 7 Rojo violáceo; 8 Azul; 9 Quimérico; 10 Otro (especificar en el descriptor **Notas 6.8**)

Color subyacente del pseudotallo

Quitar la vaina externa y observar la superficie del pseudotallo. Los valores 5 (rosado-malva), 6 (rojo-violáceo) y 7 (morado) se deben elegir sólo si se trata de una pigmentación uniforme que no permite ver un color verde o crema. (Tabla A)

1 Verde agua; 2 Verde claro; 3 Verde; 4 Crema; 5 Rosado malva; 6 Rojo violáceo; 7 Morado; 8 Otro (especificar en el descriptor **Notas, 6.8**)

Cera en las vainas: 1 Muy poca o sin signos visibles de cera; 2 Poca cera; 3 Cerosa; 4 Muy cerosa

Emergencia de los hijos: 1 Lejos de la planta madre (a más de 50 cm de la planta madre); 2 Cerca de la planta madre (crecen verticalmente); 3 Cerca de la planta madre (son muy inclinados)

Pecíolo/nervadura/hojas

Observar la tercera hoja completamente desenrollada contando a partir de la última hoja de la planta.

Manchas en la base del pecíolo:

1 Pocas; 2 Manchas pequeñas; 3 Manchas grandes; 4 Pigmentación extensa; 5 Ninguna pigmentación

Color de las manchas:

1 Marrón; 2 Marrón oscuro; 3 Marrón negruzco; 4 Negro violáceo; 5 Otro (especificar en el descriptor Notas, **6.8**)

Canal del pecíolo de la hoja III

La hoja III es la tercera hoja contando a partir de la última hoja (hoja I) desarrollada antes de la emergencia del gajo. Cortar el pecíolo en el medio entre el pseudotallo y el limbo y examinar la sección transversal.

1 Abierto con márgenes alados; 2 Abierto con márgenes erectos; 3 Estrecho con márgenes erectos; 4 Márgenes retorcidos hacia el interior; 5 Márgenes superpuestos

Color de los márgenes del pecíolo:

1 Verde; 2 Rosado malva a rojo; 3 Morado a azul; Otro (especificar en el descriptor **Notas, 6.8**)

Longitud de la lámina[cm]

Medido en su punto máximo

1 ≤ 170 cm; 2 171-220 cm; 3 221-260 cm; 4 ≥ 261 cm

Ancho de la lámina [cm]

Medida en su punto máximo

1 ≤ 70 cm; 2 71-80 cm; 3 81-90 cm; 4 ≥ 91 cm

Longitud del pecíolo [cm]

Medida desde el pseudotallo hasta la lámina

1 ≤ 50 cm; 2 51-70 cm; 3 ≥ 71 cm

Color de la cara superior de la lámina

1 Verde amarillo; 2 Verde medio; 3 Verde; 4 Verde oscuro; 5 Verde oscuro con rojo violáceo (presencia de manchas grandes rojo violáceo); 6 Azul; 7 Otro (especificar en el descriptor **Notas, 6.8**)

Color de la cara inferior de la lámina

(Quitar la cera)

1 Verde amarillo; 2 Verde medio; 3 Verde; 4 Verde oscuro; 5 Azul; 6 Rojo violáceo; 7 Otro (especificar en el descriptor **Notas, 6.8**)

Presencia de cera en la lámina

Observar la cara inferior de la lámina

1 Muy poca o sin signos visibles de cera; 2 Poca cera; 3 Cerosa; 4 Muy cerosa



Inserción de la lámina en el pecíolo

- 1 Simétrica; 2 Asimétrica

Forma de la base de la lámina

- 1 Ambas redondeadas; 2 Una redondeada/una afilada; 3 Ambas afiladas

Inflorescencia/yema masculina**Pubescencia del pedúnculo**

- 1 Glabro; 2 Poco pubescente; 3 Muy pubescente/pelos cortos (como tocar terciopelo); 4 Muy pubescente/pelos largos (> 2 mm)

Posición del racimo

(Posición de la parte fructífera). Ángulo entre la posición vertical y el eje general del racimo

- 1 Pendular verticalmente; 2 Ligeramente inclinado; 3 Oblicuo a 45°; 4 Horizontal; 5 Erecto

Forma del racimo

- 1 Cilíndrico; 2 Cono truncado; 3 Asimétrico- el eje del racimo es casi recto; 4 Con una curva en el eje del racimo; 5 En forma de espiral (todos los frutos del racimo son insertados en una sola espiral a lo largo del raquis)

Frutos

Disposición de los frutos en la corona

- 1 Uniseriados; 2 Biseriados; 3 Biseriados y fusionados

Posición del raquis

- 1 Pendular verticalmente; 2 Inclinado; 3 Con una curva; 4 Horizontal; 5 Erecto

Fruto**Posición de los frutos**

Responder sólo si los frutos se encuentran simétricamente alrededor del raquis

- 1 Curvos hacia el raquis; 2 Paralelos al raquis; 3 Curvos hacia arriba (a 45° o más); 4 Perpendicular al raquis; 5 Pendulares

Número de frutos

Observar la mano media del racimo

- 1 ≤ 12 ; 2 13-16; 3 ≥ 17

Forma de los frutos

(Curva longitudinal)

- 1 Rectos (o con curva poco marcada); 2 Rectos en la parte distal; 3 Curvos (una curva muy marcada); 4 Curvos en S (doble curva); 5 Otro (especificar en el descriptor **6.8, Notas**)

Ápice del fruto

Observado en el extremo distal del fruto

- 1 Puntigudo; 2 Largamente puntigudo; 3 Truncado; 4 En cuello de botella; 5 redondeado



2.3 Registro de datos.

El presente trabajo se realizó en la Hacienda "La Maravilla " ubicada en Kilómetro 1 ½ vía a Barbones Provincia de El Oro perteneciente al Sr. Euclides Palacios.

El lote tiene 9000 plantas de banano de la variedad Williams (AAA) que fueron generadas en el laboratorio de la empresa SEBIOCA en producción masiva *in vitro* provenientes de plantas donantes cuyos explantes fueron seleccionados en la Hacienda "Clementina" que pertenece al grupo Noboa y está ubicada en la Provincia de Los Ríos, vía Babahoyo-Montalvo.

La plantación del Señor Palacios contaba con 7 meses de siembra al momento de la evaluación durante los meses de febrero hasta Abril del 2001.

A continuación se presenta la caracterización de las plantas donantes (típicas) de la hacienda "Clementina" y plantas atípicas identificadas en campo de la hacienda "La Maravilla" (Tabla 3 hasta tabla 7)

TABLA 3

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNOS TIPOS DE PLANTAS CON RESPECTO AL HÁBITO FOLIAR, ENANISMO CON Y SIN ALTERACIÓN A LA FILOTAXIA (CAF Y SAF RESPECTIVAMENTE), ALTURA Y COLOR DEL PSEUDOTALLO.

PLANTAS	DESCRPTORES													CÓDIGO		
	Hábito foliar			Enanismo		Altura del pseudotallo			Color del pseudotallo							
	N	E	D	CAF	SAF	< 2	2.1- 2.9	>3	VA	VM	V	RV	Az		Q	Otro
Típica (donante)	X				X			X							X	N: normal
Atípica enana		X	X	X		X				X		X	X	X		E: erecto
Atípica tipo plátano							X				X					D: Decumbente
Color atípico pseudotallo						X	X				X	X	X		X	V: Verde
Atípica masada		X		X											X	A: Amarillo
Atípica gigante		X		X					X							VM: Verde medio
Atípica morado						X							X			RV: Rojo violáceo
Racimo anormal				X			X									Az: Azul
No definido				X			X		X	X						Q: Quimérico

TABLA 4

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNOS TIPOS DE PLANTAS CON RESPECTO AL COLOR SUBYACENTE DEL PSEUDOTALLO, CERA EN LAS VAINAS, EMERGENCIA DE HIJOS, MANCHA Y COLOR EN LA BASE DEL PECIOLO Y CANAL PECIOLAR DE LA TERCERA HOJA.

PLANTAS	DESCRIPTORES															CÓDIGO
	Col. Sub. del pseudot.			Cera vainas			Emergen. hijos	Manch. base pec.			Col. Manch.			Can. Pec. hoja II		
	RM	RV	O	P	C	MC	Crece vertic.	P	PQ	PE	M	MO	O	AMA	AME	
Típica (donante)	X				X		X			X	X			X		
Atípica enana				X		X		X	X				X			
Atípica tipo plátano		X		X					X							
Color atípico pseudotallo								X					X			
Atípica masada			X	rayado				rayado				X				
Atípica gigante												X			X	
Atípica morado													X			
Racimo anormal								X								
No definido									X				X			

R M: Rosado malva
 RV: Rojo violáceo
 P: Poca
 MC: Mucha cera
 PQ: Pequeñas
 PE: Pigmentación extensa
 M: Marrón; O: Oscuro
 AMA: Abierto márgenes alados
 AME: Abierto márgenes erectos

TABLA 5

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNOS TIPOS DE PLANTAS CON RESPECTO AL COLOR DE LOS MÁRGENES Y LONGITUD DEL PECÍOLO; LONGITUD, ANCHO Y COLOR DE LA CARA SUPERIOR DE LA LÁMINA.

PLANTAS	DESCRIPTORES																
	Col.márg. del pec.			Longitud de la lámina (cm)			Ancho de la lámina (cm)				Long. Pec. (cm)			Col.cara sup. lámina			
	V	RMR	O	171-220	221-260	> 261	< 70	71-80	81-90	>91	< 50	51-70	> 71	VA	V	VO	VORV
Típica (donante)	X				X					X	X					X	
Atípica enana				X				X	X					X	X		
Atípica tipo plátano				X					X					X			
Color atípico pseudotallo				X			X								X		X
Atípica masada	rayado			Hoja completamente deforme											X		
Atípica gigante						X	X					X			X		
Atípica morado			X	X					X				X		X		
Racimo anormal				X				X							X		
No definido	X			X				X	X						X		

CÓDIGO

V: Verde
 RMR: Rosado malva a rojo
 O: Otro
 VA: Verde amarillo
 VO: Verde oscuro
 VORV: Verde oscuro con rojo violáceo

TABLA 6

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNOS TIPOS DE PLANTAS CON RESPECTO AL COLOR DE LA CARA INFERIOR, PRESENCIA DE CERA, INSERCIÓN Y FORMA DE LA BASE DE LA LÁMINA; PUBESCENCIA DEL PEDÚNCULO Y POSICIÓN DEL RACIMO.

PLANTAS	DESCRIPTORES															CÓDIGO	
	Col.cara inf. Lam.		Pres. cera lám.			Inserc. Lám. pec.		Forma base de la lámina			Pub. Ped.		Posición del racimo				
	VM	V	MP	P	C	Sim.	Asim.	AR	Una red./una afil.	AA	G	PP	PV	Ll	Oblicuo a 45°		
Típica (donante)	X				X	X			X			X	X				
Atípica enana		X		X			X	X			X						
Atípica tipo plátano				X				X			X			X			
Color atípico pseudotallo								X			X						
Atípica masada			X			No definida					X				X		
Atípica gigante				X				X		X							
Atípica morado							X										
Racimo anormal											X			X			
No definido								X									

V: Verde; M: medio
 MP: Muy poca; P: Poca
 C: Cerosa
 AR: Ambas redondeadas
 AA: Ambas afiladas
 G: Glabro
 PP: Poco pubescente
 PV: Pendular verticalmente
 Ll: Ligeramente inclinado

TABLA 7

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNOS TIPOS DE PLANTAS CON RESPECTO AL RACIMO, FRUTOS Y RAQUIS.

PLANTAS	DESCRIPTORES										
	Forma del racimo	Frutos	Pos. raquis		Posición frutos	# frutos		Forma frutos		Ápice del fruto	
	Cilíndrico	Biseriados	PV	Hor.	Curvos hacia arriba	13 - 16	> 17	Curvos	Otro	Trunc.	redond.
Typica (donante)	X	X	X		X		X	X		X	
Atípica enana											X
Atípica tipo plátano						X					X
Color atípico pseudotallo						X					X
Atípica masada	No definido			X	Deformes		X		X	No definido	
Atípica gigante											
Atípica morado											
Racimo anormal											
No definido											

CÓDIGO

PV: Pendular verticalmente

Hor.: Horizontal

Capítulo 3

3.MÉTODOS DE EVALUACIÓN.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las variantes fenotípicas ocurridas en la propagación masiva in-vitro de banano variedad Williams realizada bajo las condiciones de Sebioca, Ecuador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y clasificar los descriptores útiles para la caracterización fenotípica de banano, grupo Cavendish var. Williams cultivado *in-vitro*, a partir de la lista de descriptores del INIBAP.
- Caracterizar las plantas de banano variedad Williams que fueron usadas como donantes.
- Determinar y evaluar la presencia de la variación somaclonal de las plantas de banano variedad Williams micropropagadas por SEBIOCA.

3.1 Variables en estudio.

Caracteres morfológicos y de color variables, encontrados en la plantación, frente a los descriptores típicos de la variedad Williams.

PROCEDIMIENTO

Se procedió a caracterizar la variedad Williams donante que pertenece a la Hacienda Clementina con la intención de conocer la variedad y poder identificar plantas que no esten acorde con su característica fenotípica.

Una vez caracterizada la variedad se recorrió la hacienda "La Maravilla", donde se sembraron 9000 plantas meristemáticas y mediante observación de toda la población, se detectaron 143 plantas atípicas a las que se procedió a identificar y caracterizar.

MATERIALES

- A. Plantas donantes.

Plantaciones de banano variedad Williams donantes provenientes de la Hacienda "Clementina" de Corporación Noboa ubicada en la Provincia de Los Ríos en floración y

- B. plantas provenientes de cultivo *in vitro*, de la hacienda "La Maravilla" del Señor Euclides Palacios ubicada en la provincia del Oro recomendadas por la mayor evidencia de variantes fenotípicas, con 7 meses de edad.

- Cámara fotográfica digital.

METODOS

- Tabla A y B de los descriptores del INIBAP y tabla de colores Munsell.
- Lista de descriptores para el banano publicada por INIBAP.
- Hojas de registro.

3.2 Diseño experimental.

Se utilizó "La Distribución de Frecuencias" y caracterizando la variabilidad fenotípica de la población estudiada, frente a la caracterización típica de la variedad Williams, acorde con los descriptores de INIBAP.



PLANTAS ATÍPICAS

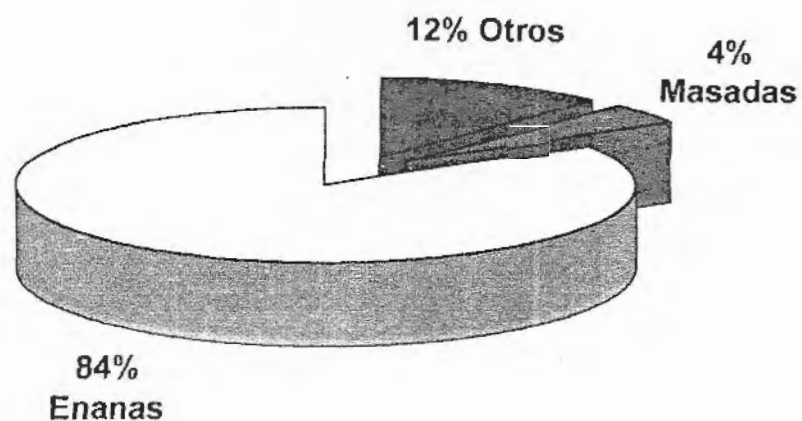


FIGURA 1. PORCENTAJE DE PLANTAS ATÍPICAS DE LA VARIEDAD WILLIAMS, OBTENIDAS EN LA HACIENDA LA MARAVILLA DEL SEÑOR EUCLIDES PALACIOS, PROVINCIA DEL ORO, MAYO DEL 2001

Estos resultados expuestos anteriormente se corrobora lo afirmado en las conclusiones expuestas por investigadores tales como Reuveni (1989) y Stover (1987), razón por la cual esta investigación cobra mayor importancia (43; 56).

A continuación se describen con distribución e histogramas de frecuencia los descriptores más representativos:

TABLA 8

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA HÁBITO FOLIAR

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Erecto	1 - 1.8	27	19
Normal	1.9 - 2	113	80
Decumbente	2.6 - 3	2	1

El carácter (descriptor) hábito foliar muestra el 80% de plantas con característica normal, esto quiere decir que los caracteres morfológicos de las plantas estudiadas corresponde a una línea de plantas triploide lo que concuerda con las características de la variedad progenitora; 19% con carácter erecto, muy común en diploides y 1% decumbente, característica de los tetraploides (Tabla 8 y figura 2).

El hábito foliar normal se manifiesta en todas las variantes atípicas. El hábito erecto se presenta en plantas atípicas enanas, masadas y gigantes. El decumbente solo fue observado en una planta enana (Tabla 3)

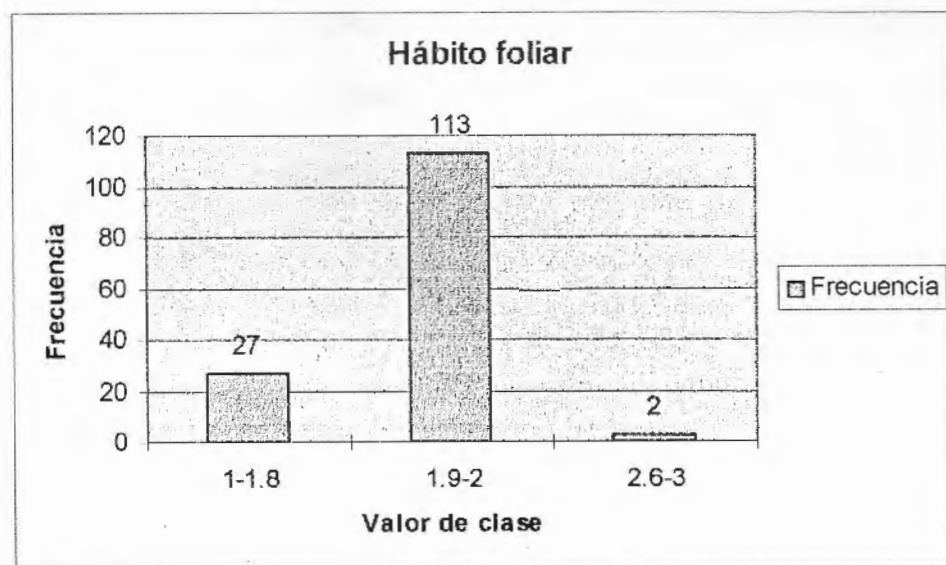


FIGURA 2. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA HÁBITO FOLIAR

TABLA 9

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA ENANISMO

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Sin alteración de la filotaxia	1-1.5	32	23
Con alteración de la filotaxia	1.5-2	110	77

El carácter "enanismo" muestra el 77% de plantas con alteración de la filotaxia, las hojas se superponen; el 23% restante no muestra alteración de la filotaxia (Tabla 9 y figura 3).

Sin embargo la alteración de la filotaxia no es sinónimo de planta pequeña o de baja talla, pudiéndose observar esta alteración en plantas atípicas como la

enana, masada, gigante, anormal y en plantas no identificadas que pueden ser la resultante de problemas de medio ambiente o fertilización, la verificación de estos caracteres, podrían demostrarse o no con un análisis molecular del genoma.

Adicionalmente, fueron encontradas plantas "enanas" sin alteración de la filotaxia en diferentes plantas atípicas (Tabla 3)

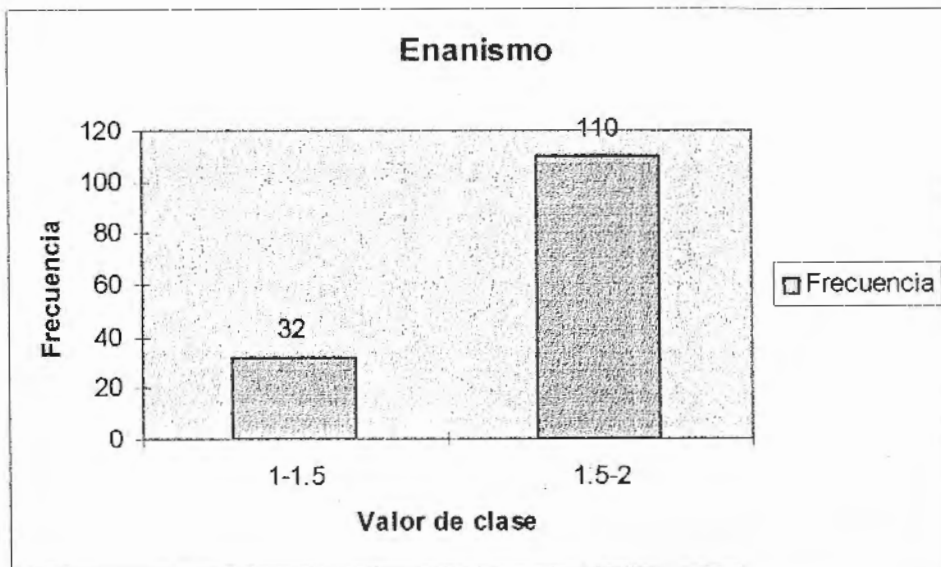


FIGURA 3. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA ENANISMO



TABLA 10

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA ALTURA DEL PSEUDOTALLO

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Inferior a los 2 metros	1-1.9	120	85
Entre 2.1 y 2.9	2-2.8	13	9
mayor a 3 metros	3,0	9	6

Para el carácter (descriptor) altura del pseudotallo el 85% de las plantas atípicas se encuentran en rangos inferiores a los 2 metros catalogándose como enanas con alteración de la filotaxia, pecíolos cortos, variación en la longitud y ancho de la lámina foliar, flores persistentes ; caracteres que conuerdan con lo expresado por varios autores (10; 24; 43; 56); El 9% de las plantas atípicas estuvieron en rangos comprendidos entre 2.1 y 2.9 metros de talla mostrando un aspecto atípico tipo plátano, otros con color atípico del pseudotallo, plantas atípicas con racimo anormal y variantes que no fueron definidas.

Plantas atípicas con alturas mayores a 3 metros presentaron el 6% que se evidencia en variantes gigantes, tipo plátano, color atípico del pseudotallo, masadas (rayadas) y racimo anormal (Tabla 3, tabla 10 y figura 4)

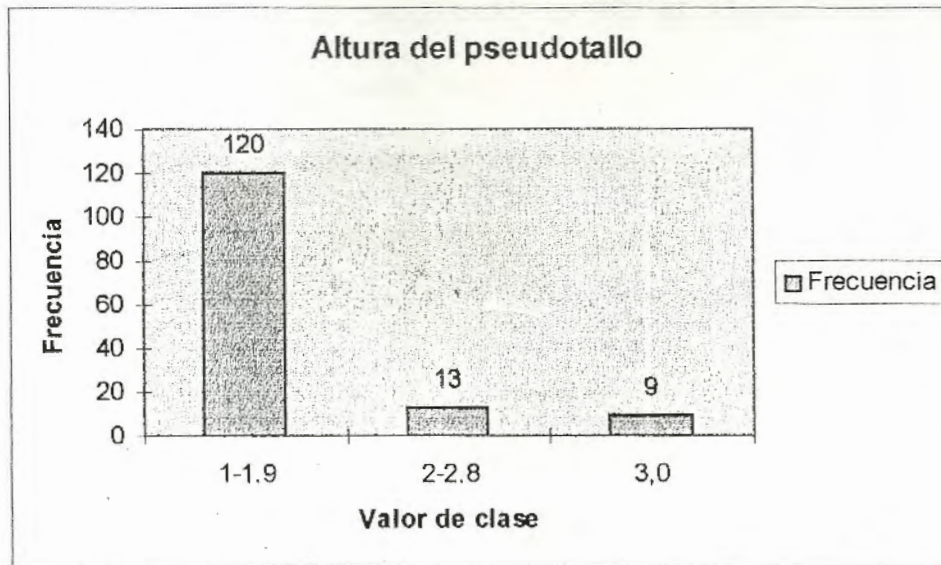


FIGURA 4. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA ALTURA DEL PSEUDOTALLO

TABLA 11

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA COLOR DEL PSEUDOTALLO

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Verde amarillo	1-1.9	5	3
Verde medio	2-2.9	117	82
Verde	3-3.9	3	2
Verde oscuro	4-4.9	0	0
Verde rojizo	5-5.9	0	0
Rojo	6-6.9	0	0
Rojo violáceo	7-7.9	8	6
Azul	8-8.9	1	1
Quimérico	9-9.9	3	2
Otros	10-10.9	6	4

Para el descriptor "color del pseudotallo" el 3% de plantas muestra color verde amarillo; 82% color verde medio; 2% color verde; 6% color rojo violáceo; 1% color azul o morada; 2% color quimérico (no se pudo definir el color de la planta) y 4% con características de rayada o masadas (Tabla 11 y Figura 5).

El color verde amarillo es la característica de plantas atípicas gigante y no definida; la coloración verde medio fue encontrado en plantas atípicas enanas y no definidas; el color verde se manifestó en plantas atípicas tipo plátano y color atípico del pseudotallo; el rojo violáceo fue encontrado en plantas atípicas enanas y plantas con color atípico del pseudotallo; el color azul se evidenció en plantas atípicas enanas, en masadas caracterizándose con un rayado excesivo del pseudotallo y plantas atípicas moradas que por lo general son eliminadas en la fase de aclimatación (23); los colores quiméricos se presentaron en plantas atípicas enanas y masadas que presentaron un rayado excesivo del pseudotallo, bases del pecíolo y pecíolos; colores como el marrón oscuro y negro se manifestaron en plantas con color atípico del pseudotallo; el color verde claro con el que se caracterizó la plantación de la Hacienda Clementina no se manifestó en ninguna de las variantes (Tabla 3)

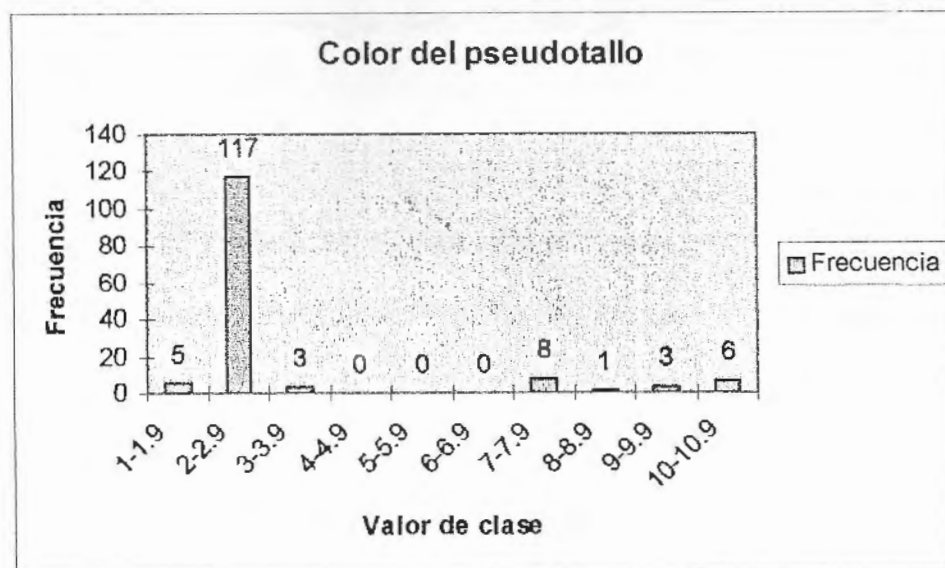


FIGURA 5. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA COLOR DEL PSEUDOTALLO

TABLA 12

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA MANCHAS EN LA BASE DEL PECÍOLO

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Pocas	1-1.9	14	10
Manchas pequeñas	2-2.9	121	87
Manchas grandes	3-3.9	1	1
Pigmentación extensa	4-4.9	3	2
Ninguna Pigmentación	5-5.9	0	0



Se caracterizaron 10% de plantas con pocas manchas; 87% con manchas pequeñas; 1% con manchas grandes; 2% con pigmentación extensa (Tabla 12 y figura 6)

Para el carácter "manchas en la base del pecíolo", estas se presentan en pequeño número en la variación atípica enana, en el color atípico del pseudotallo y en la planta con racimo anormal; manchas pequeñas fueron caracterizadas en plantas atípicas enanas, tipo plátano y no definidas; pigmentación extensa se manifestó en todas las variantes atípicas. Hay que destacar que las plantas atípicas masadas o mosaico muy similares a las descritas por diferentes autores (10) mostraron el carácter con manchas y rayado excesivo con color marrón o quimérico en algunos casos (Tabla 4)

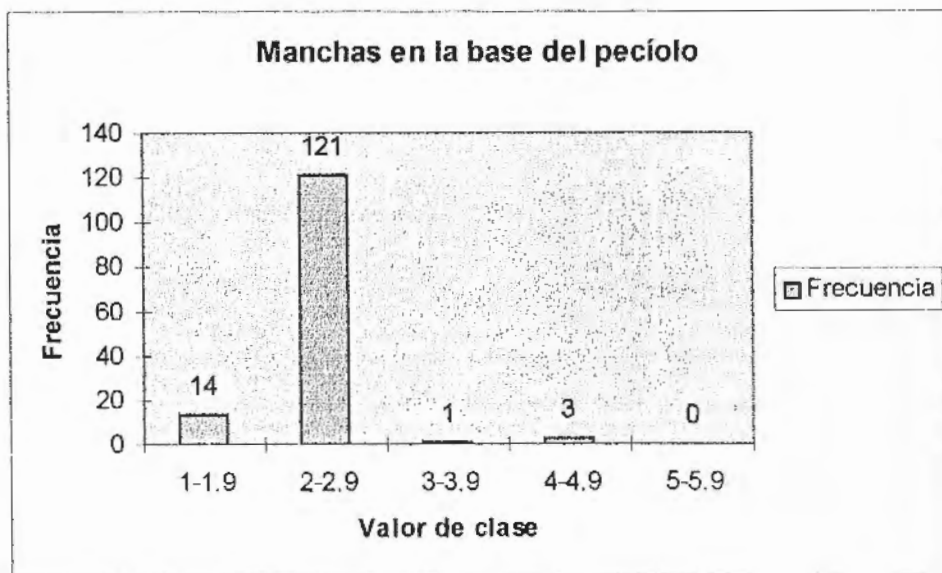


FIGURA 6. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA MANCHAS EN LA BASE DEL PECÍOLO

TABLA 13

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA LONGITUD DE LA LÁMINA

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Menor a 170 cm	1-1.9	15	11
Entre 171 y 220 cm	2-2.9	113	84
Entre 221 y 260 cm	3-3.9	2	1
Mayor a 261 cm	4-4.9	5	4

En lo que respecta a la longitud de la lámina se caracterizaron 11% de plantas con rangos menores a 170 centímetros; 84% con rangos entre 171 y 220 cm; 1% entre 221 y 260 centímetros; y 4% con longitud mayor a 261 centímetros (Tabla 13 y figura 7).

El rango entre 171 y 220 se encuentra en todas las plantas atípicas con excepción de la gigante; la longitud entre 221 y 260 se encontró en todas las variantes atípicas; la longitud mayor a 261 centímetros se notó en plantas atípicas gigantes, las cuales reúnen las características citadas por diferentes autores (2; 10) (Tabla 5).

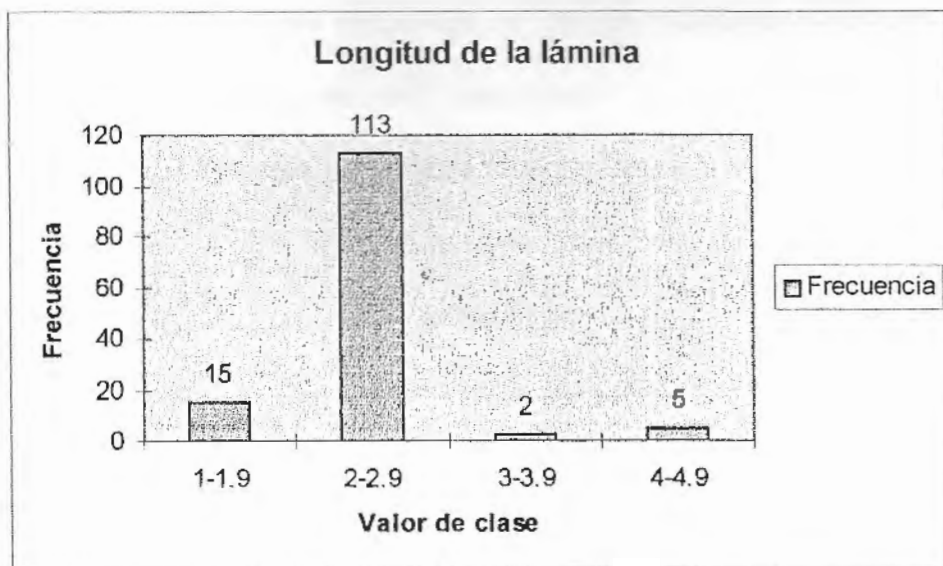


FIGURA 7. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA LONGITUD DE LA LÁMINA

TABLA 14

DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS PARA ANCHO DE LA LÁMINA

Clase	Valor de Clase	Frecuencia	%
Menor a 70 cm	1-1.9	9	7
Entre 71 y 80 cm	2-2.9	20	15
Entre 81 y 90 cm	3-3.9	105	78
Mayor a 91 cm	4-4.9	1	1

El ancho de la lámina muestra el 7% de plantas en los rangos menores a 70 centímetros; el 15% con variaciones que corresponden a rangos entre 71 y 80 centímetros; 78% con rangos entre 81 y 90 centímetros y 1% con un rango mayor a 91 centímetros (Tabla 14 y figura 8)

El ancho de la lámina se encuentra en rangos menores a 70 centímetros para las variantes atípicas del pseudotallo y gigante; entre 71 y 80 centímetros se manifiesta en plantas atípicas enanas, con racimo anormal y no definidas; los rangos entre 81 y 90 se presentan en variaciones atípicas enanas, tipo plátano, con racimo anormal y no definidas; rangos superiores a 91 centímetros fueron encontrados en todas las variantes con excepción de gigante y no definidas (Tabla 5).

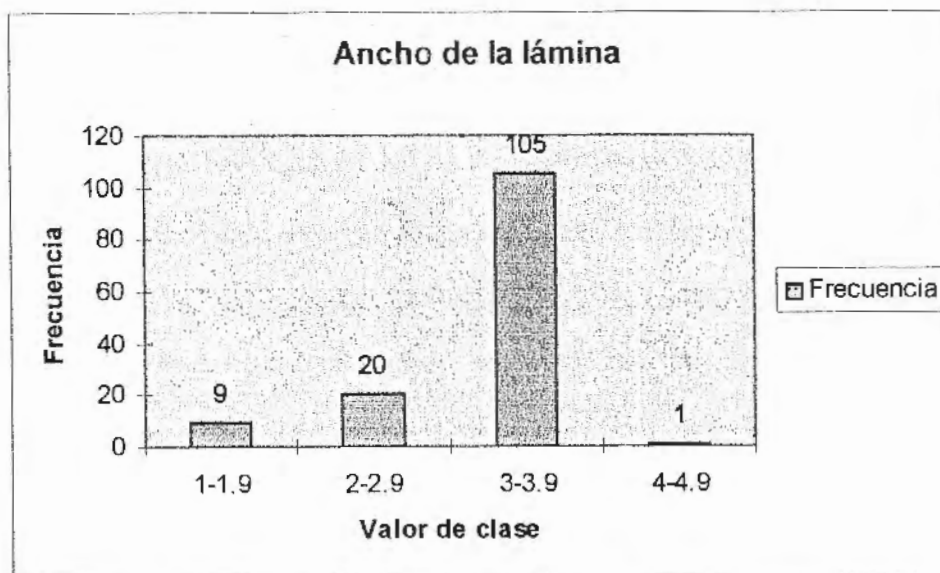


FIGURA 8. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO PARA ANCHO DE LA LÁMINA

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de variaciones en la plantación estudiada es del 1.59% en plantas de la variedad Williams que a decir del propietario y el Asesor, provienen de cultivo *in vitro* bajo las condiciones de SEBIOCA, lo que significa que se mantiene dentro del rango de tolerancia citada por varios autores.
2. La mayor tendencia de variación es hacia plantas atípicas enanas con una moda del 83.92%.

RECOMENDACIONES

1. Seleccionar los descriptores hábito foliar, enanismo, altura y color del pseudotallo, manchas en la base del pecíolo, longitud y ancho de la lámina, para futuras investigaciones sobre variabilidad inducida en el cultivo *in vitro* de la variedad "Williams".
2. Complementar esta investigación con la caracterización de la variación somaclonal desde la fase de traslado de *in vitro* a vivero, en la expresión en vivero y posteriormente en campo, para saber el porcentaje real de inducción de variabilidad en laboratorio.
3. Utilizar herramientas moleculares para caracterizar estas variantes en su genotipo.

TERISTEMAS PROVENIENTE

ANEXOS

1000

1000

PLANTACIÓN MERISTEMAS PROVENIENTES IN
VITRO





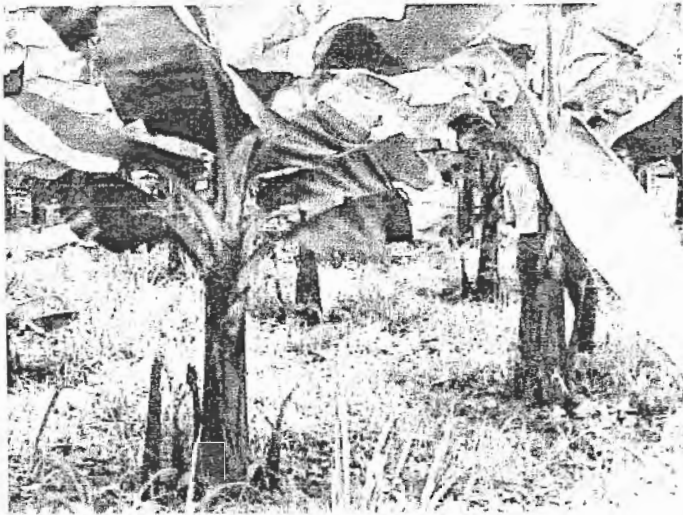
Plantas atípicas-Variación enana



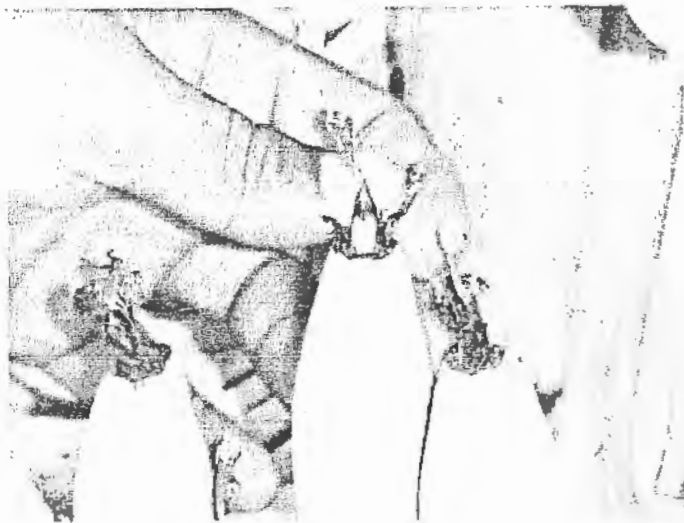
Anexo 1.-Planta enana sin racimo Anexo 2.- Planta hija enana



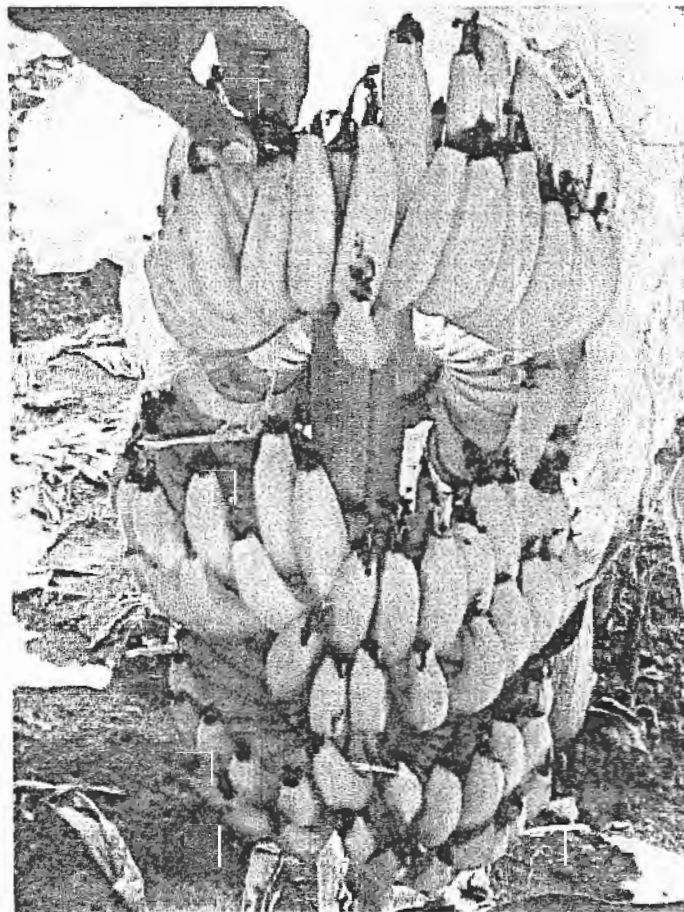
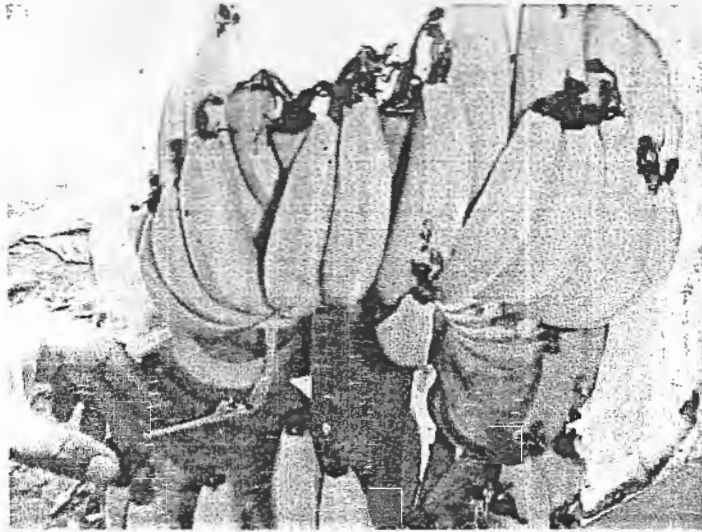
Anexo 3.- Planta hija enana Anexo 4.- Planta enana sin racimo.



Anexo 5.- Planta enana, hábito foliar tipo enano.



Anexo 6.- Flores persistentes.



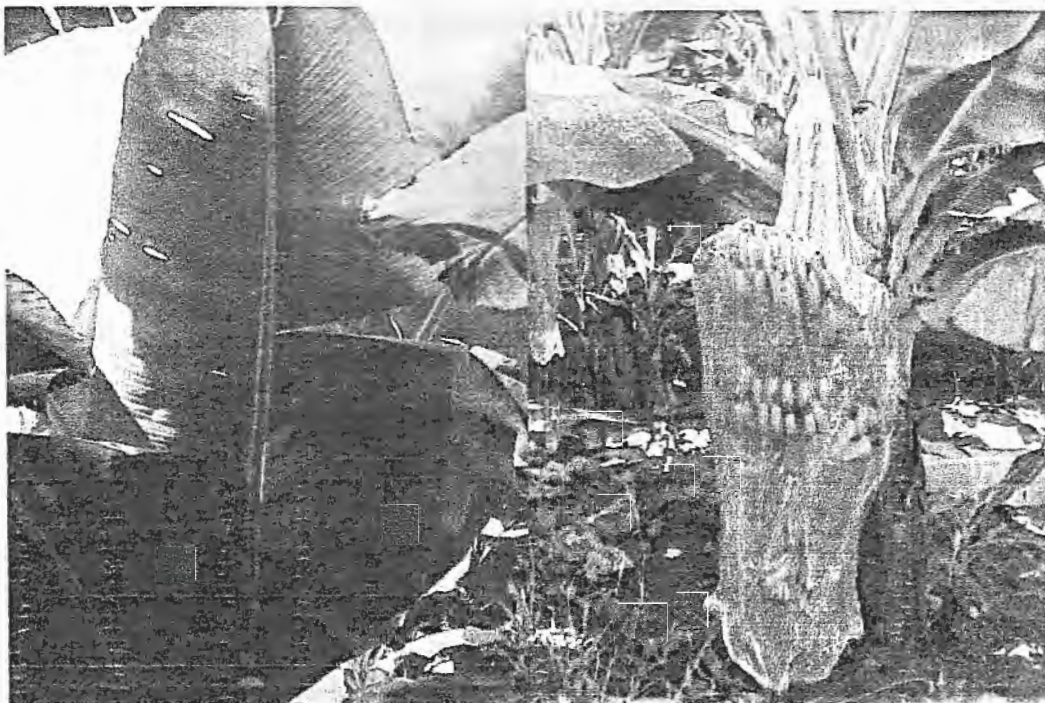
Anexo 7.- Racimos con flores persistentes en plantas atípicas enanas



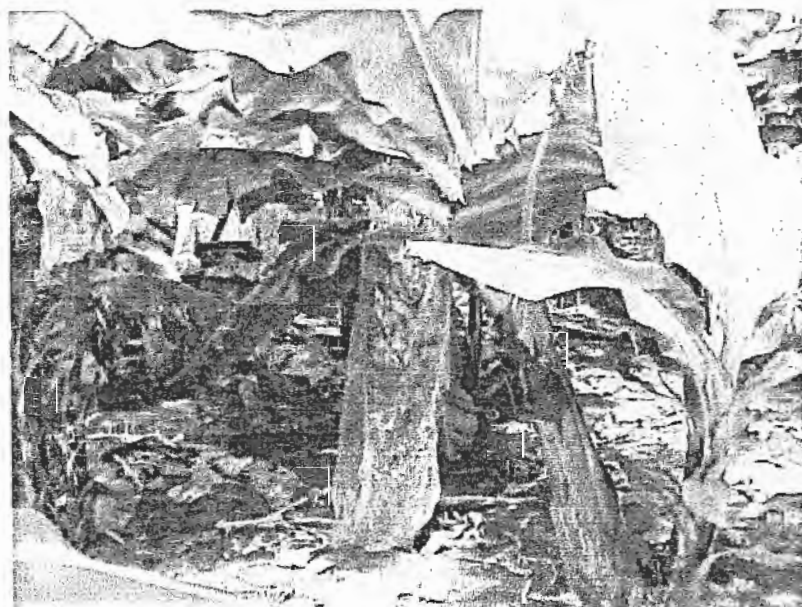
Anexo 8.- Planta enana con racimo.



Anexo 9.- Racimo planta normal VS. racimo planta enana

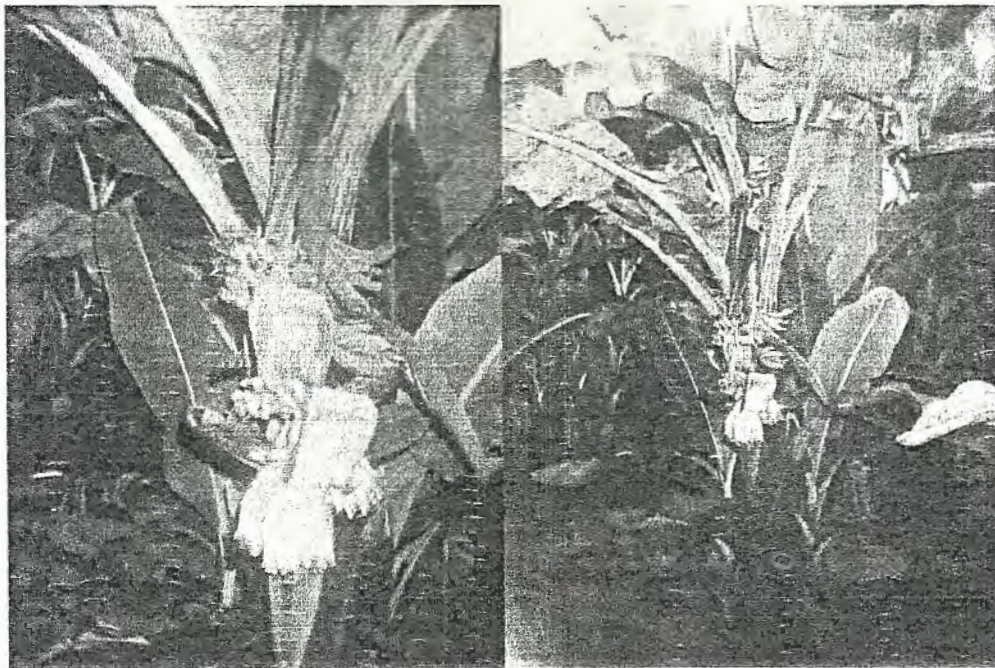


Anexo 10.- Lámina foliar (enana) Anexo 11.- Racimo planta enana

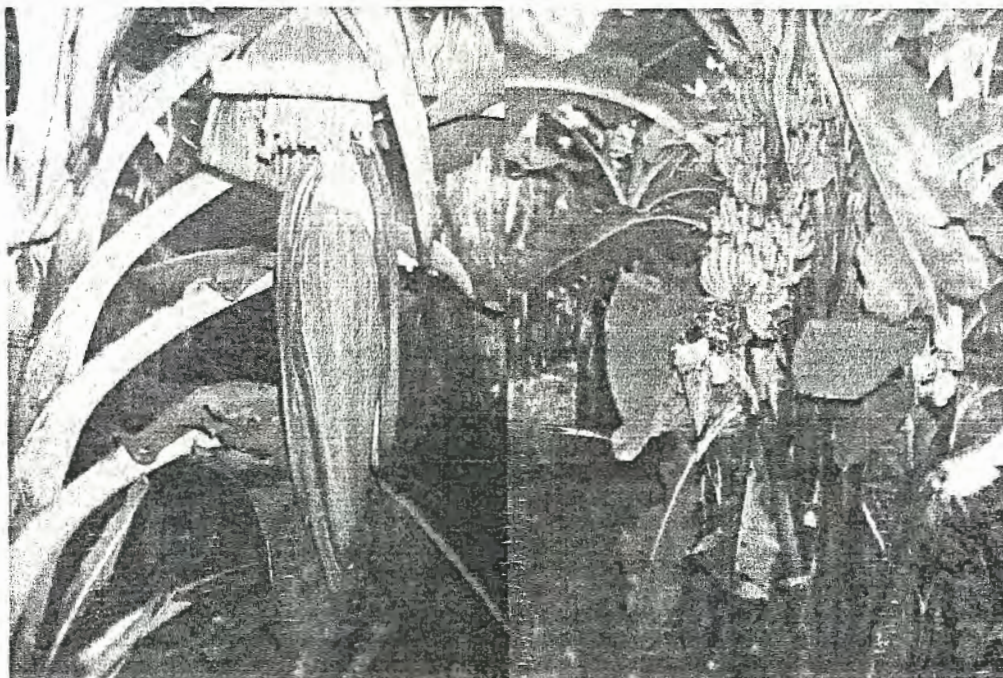


Anexo 12.- Racimo planta enana

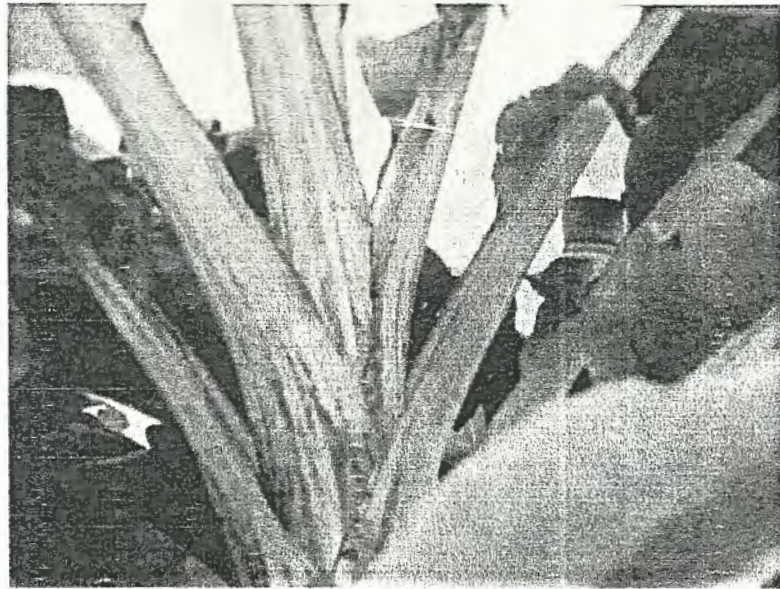
Plantas atípicas-variación masada



Anexo 13.- Racimo planta masada Anexo 14.- Planta atípica masada.



Anexo 15.- Flor masculina Masada Anexo 16.- Racimo Planta masada.



Anexo 17.- Peciolos de planta masada (Rayado)



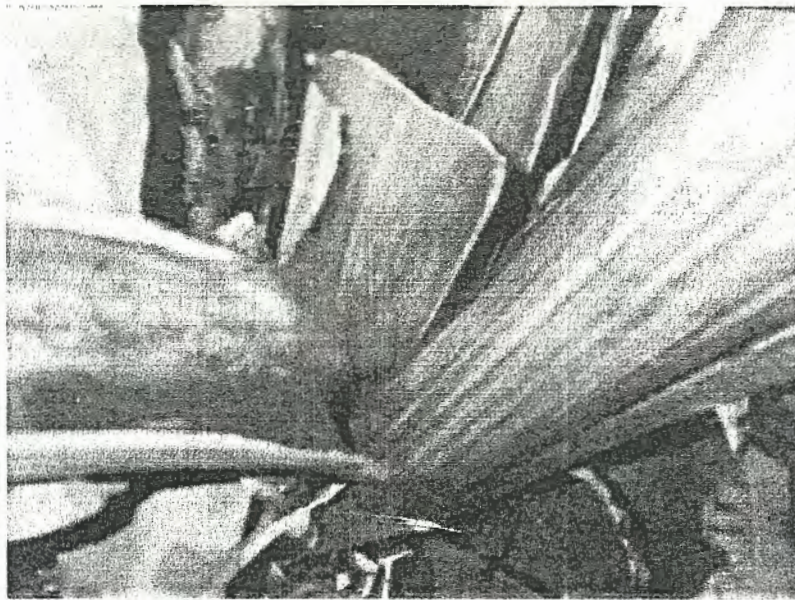
Anexo 18.- Hojas planta masada (deformes)



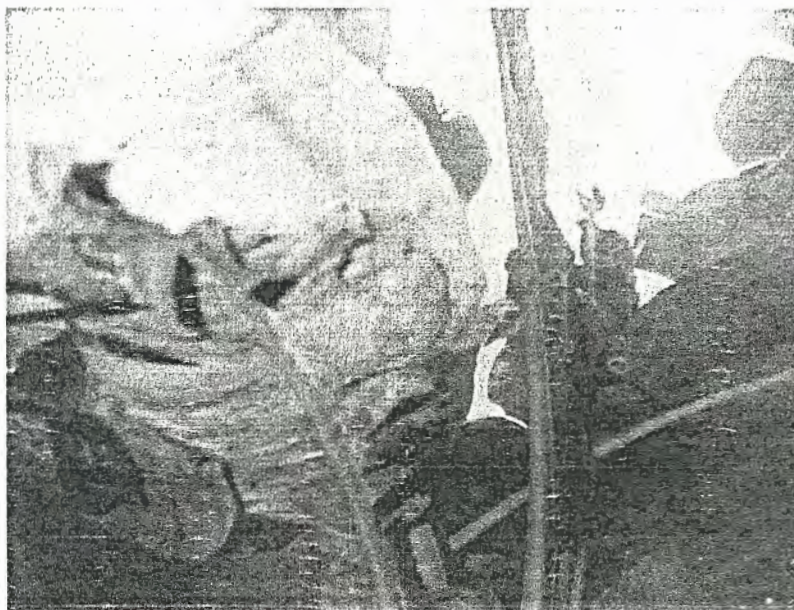
Anexo 19.- Vaina del pecíolo planta masada (rayado)



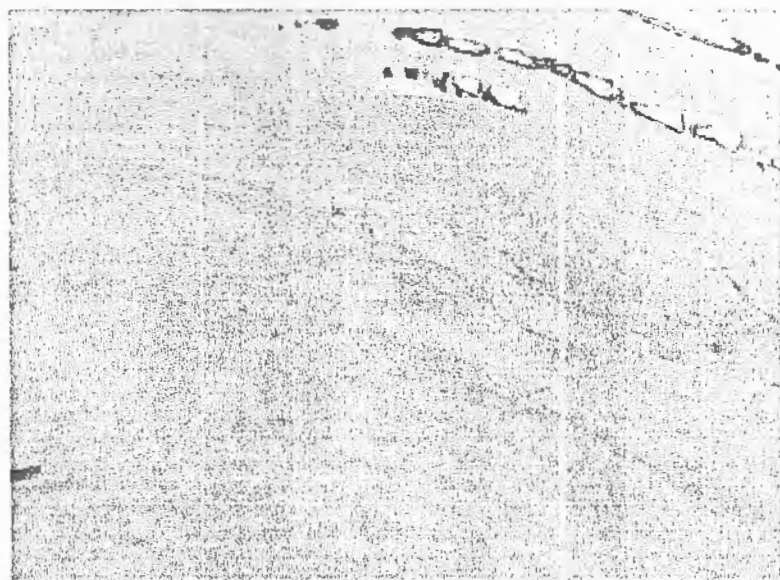
Anexo 20.- Racimo planta Masada VS. racimo planta normal.



Anexo 21.- Color subyacente del pseudotallo (rayado)



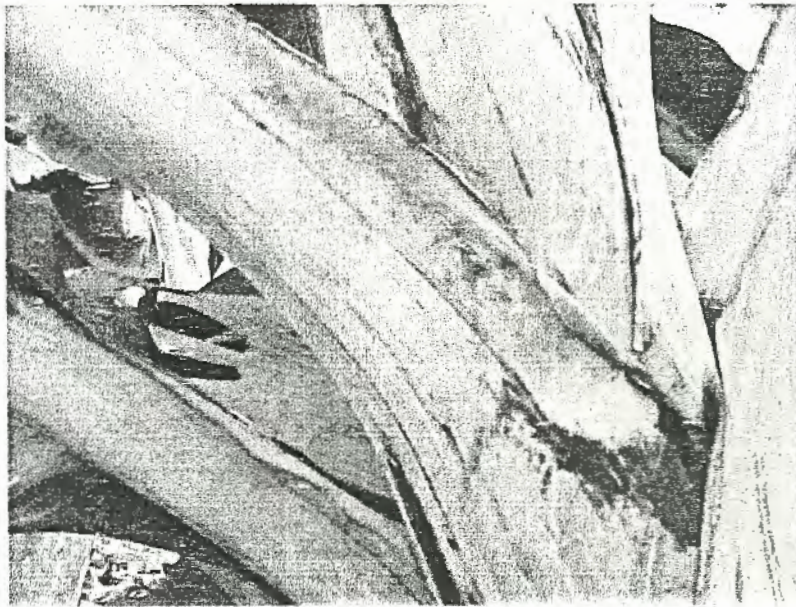
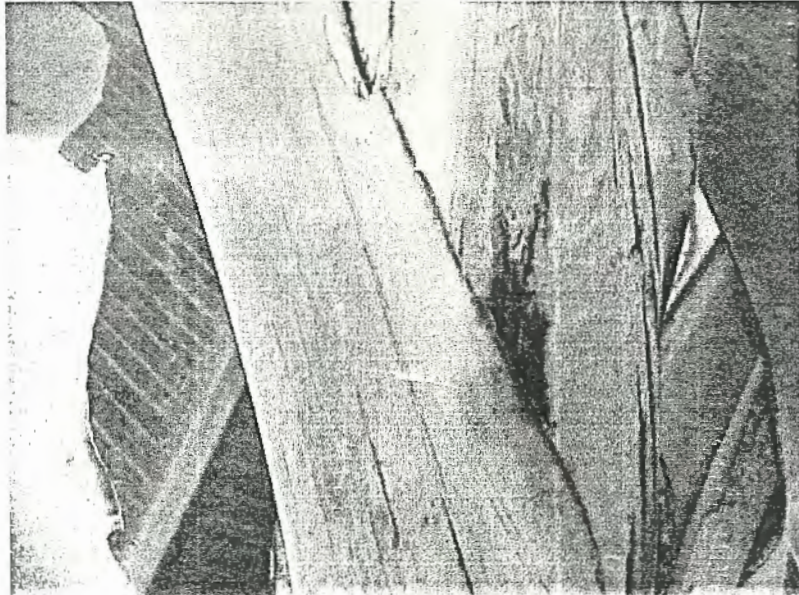
Anexo 22.- Hojas planta masada (deformes).



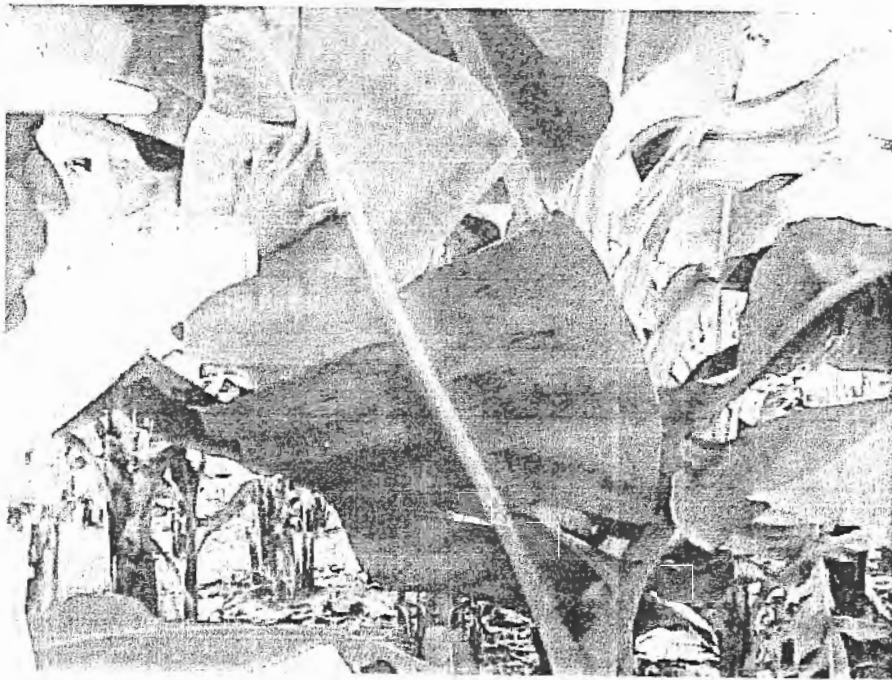
Anexo 23.- Envés planta masada



Anexo 24.- Pecíolos planta atípica masada (rayado)

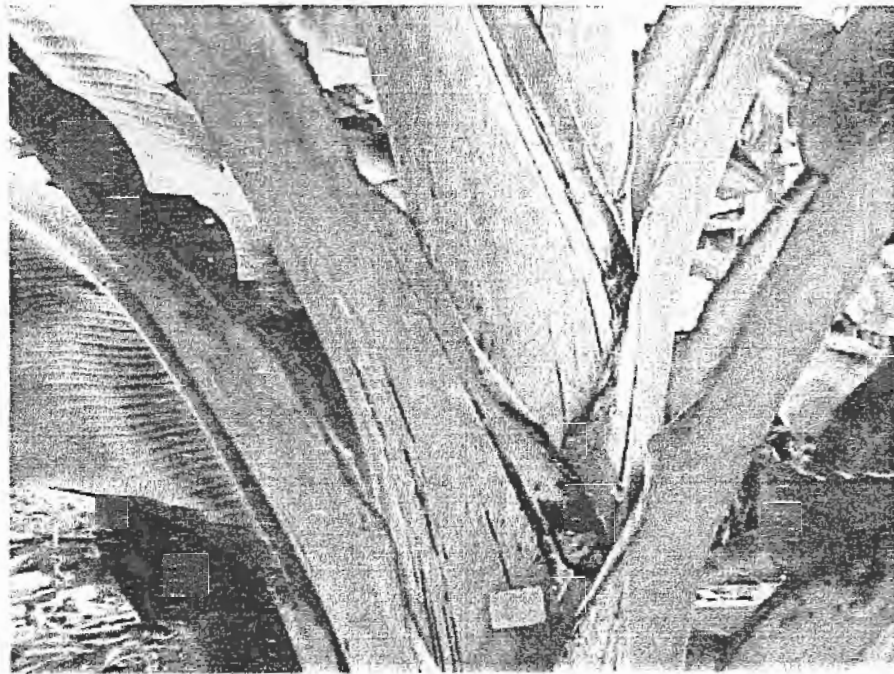


Anexo 25.- Pecíolos planta masada (rayado)



Anexo 26.- Hoja planta atípica masada (hija)

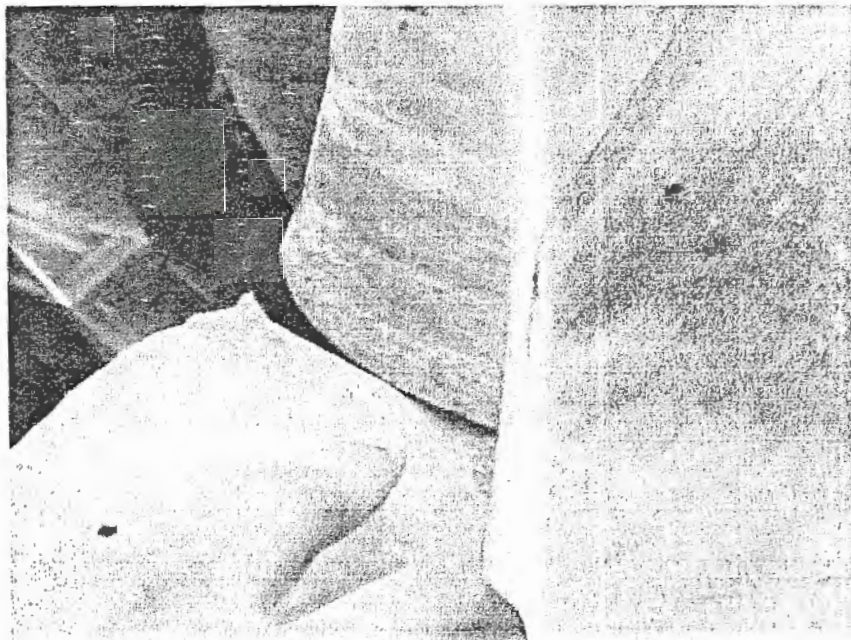




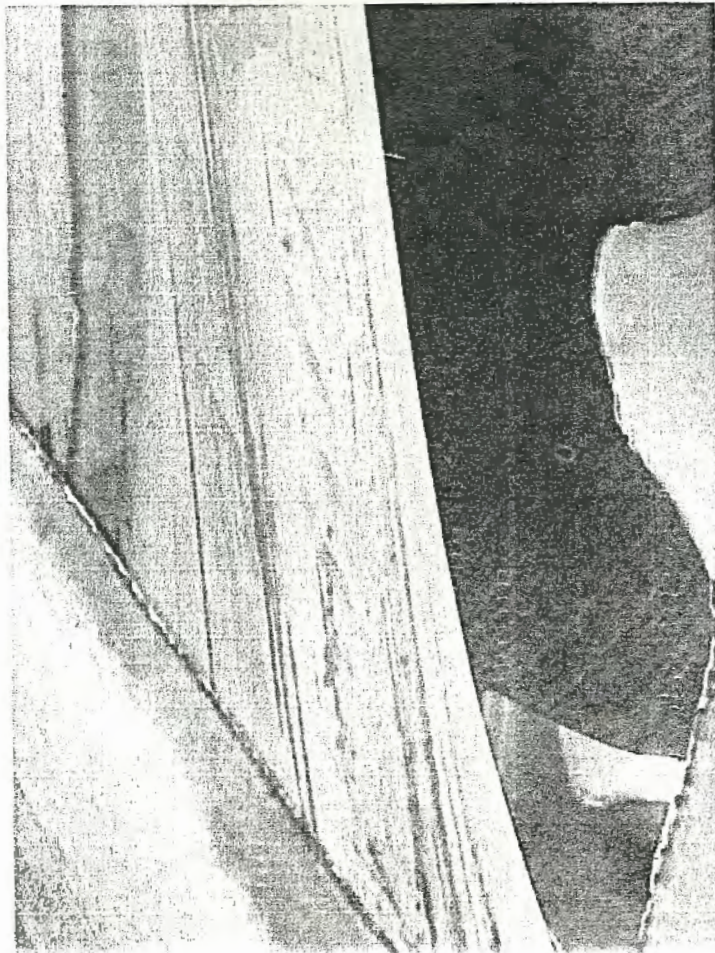
Anexo 27.- Planta masada- Nótese el hábito foliar (tipo enano)



Anexo 28.- Hijos planta masada (2da. generación)

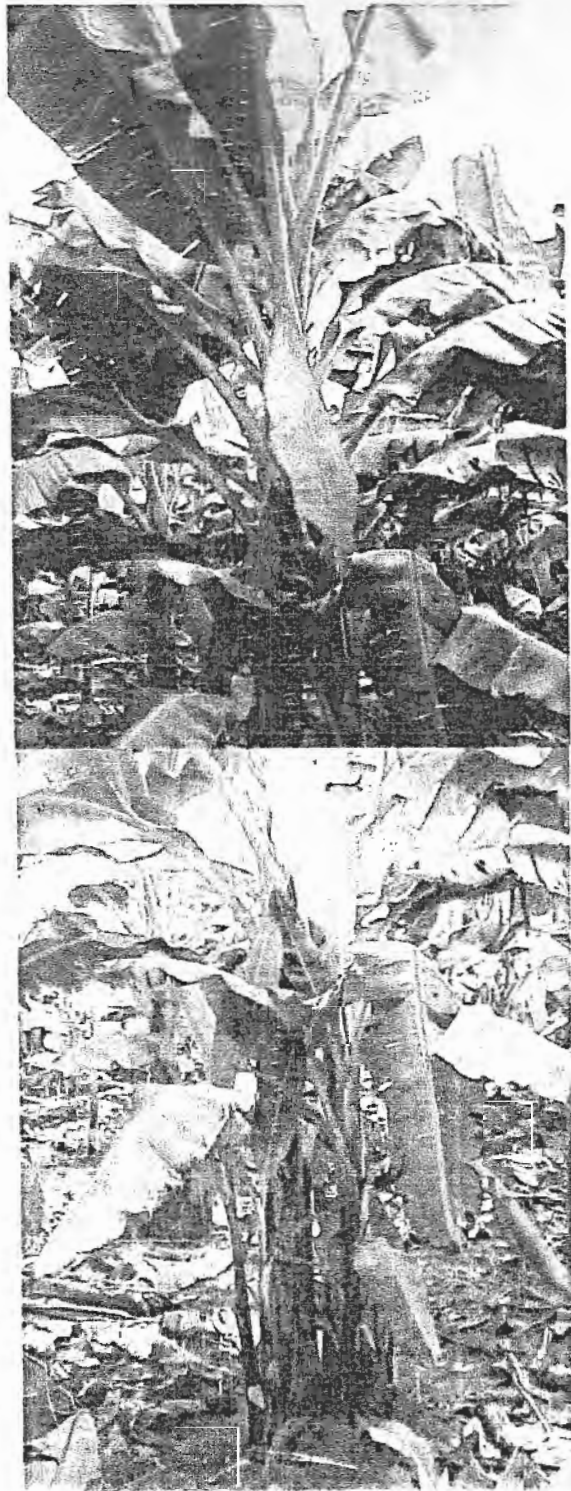


Anexo 29.- Envés planta masada (hijos)



Anexo 30.- Pecíolo planta hija masada (rayado)

Planta atípica- gigante

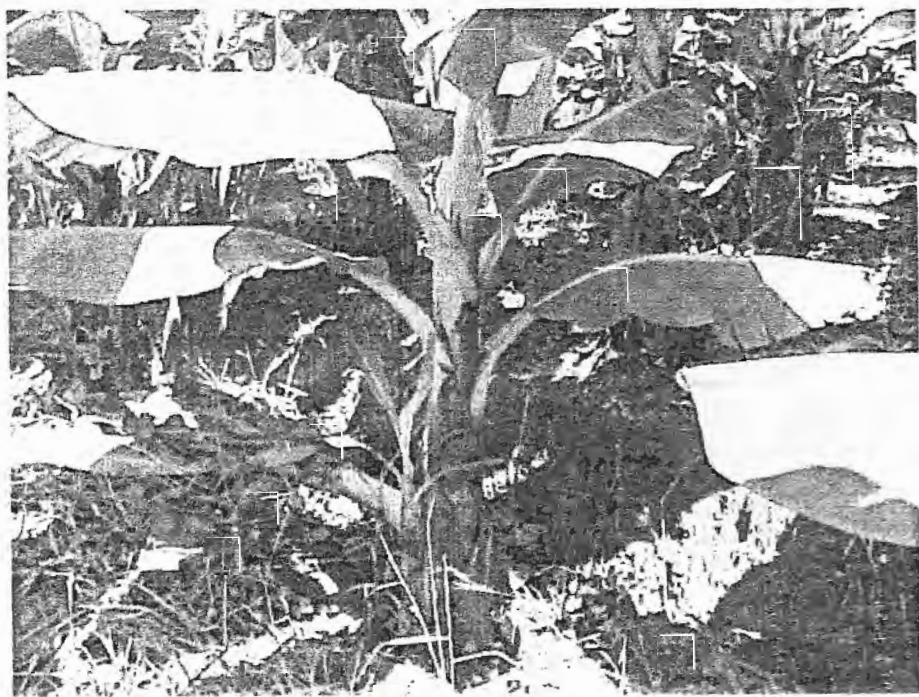


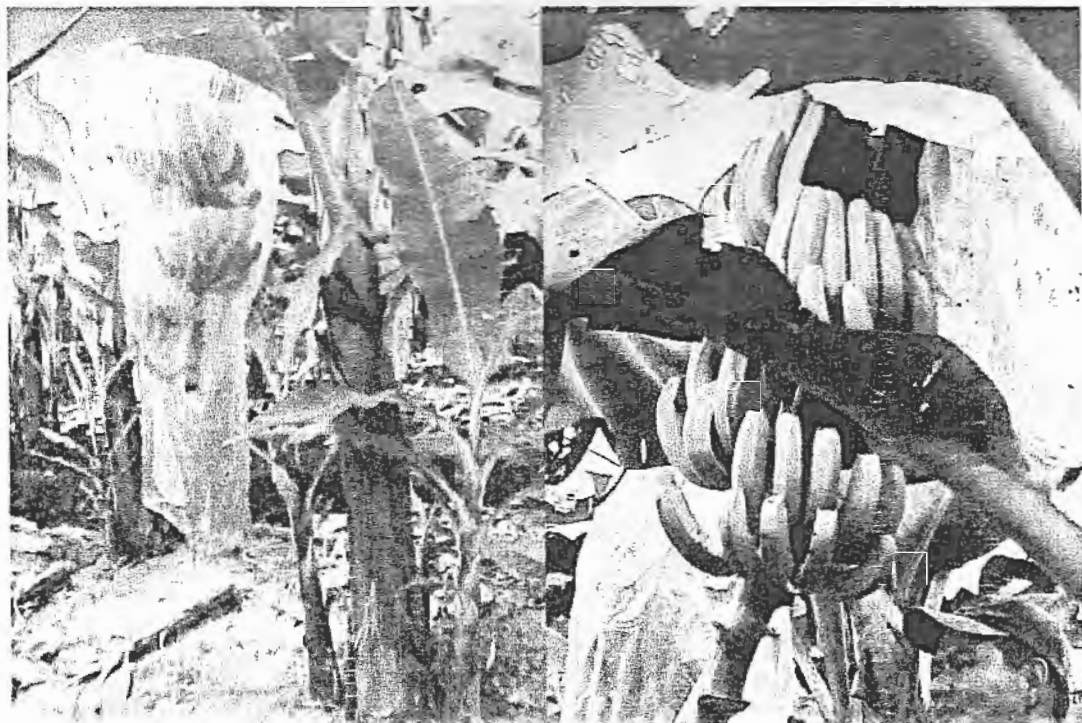
Anexo 31.- Planta gigante.



Anexo 32.- Hoja gigante VS. Hoja normal

Anexo 34.- Plantas coloración atípica del pseudotallo.





Anexo 35.- Planta tipo plátano (coloración atípica del pseudotallo)



Anexo 36.- Planta con coloración atípica del pseudotallo



Anexo 37.- Pseudotallo negro (coloración atípica del pseudotallo)



BIBLIOGRAFÍA

1. ARGENT, G.C.G., 1976. the wild bananas of papua New Guinea. Notes on Royal Botanic Garden (Edinburgh) 35: 77-114.
2. ARIAS, O y VALVERDE, G. 1987. Performance somaclonal variation *in vitro* of propagated banana plant Abs. Intert Congress of Plant Tissue culture of Tropical species. Colombia. 77-78.
3. BERG, L.A. AND BUSTAMANTE, M. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. Phytopathology 64: 320-322
4. CASSELLS AC, 1991. Problem in tissue culture: culture contamination, En: Micropropagation. Debergh P, Zimmerman RH. (Eds) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 31-45.
5. CHEESMAN, E.E., 1948. On the nomenclature of edible bananas. Journal of Genetics 48: 293-296
6. COBLEY, L.S. AND STEELE, W.M., 1976. An Introduction to the botany of tropical crops. 2nd. Edition. Longman, London.
7. COTE, F.;ALVARD, D.; DOMERGUE, R; NAVARRO, L. And YETEISSON, C. Micropropagation *in vitro* du Bananier, Fruits In: Cultivo Y Comercialización del Banano. SOTO, M.pp: 700
8. CRONAUER, S.S. and KRIKORIAN. A.D. 1984. Multiplication of *Musa* from Excised Stem Tips. Annals of Botany, 53:321-328.

9. DANIELS, 1995. Incidence and form of somaclonal variation reported for *in vitro* propagated bananas and plantains. In: Bananas and Plantains. Gowen S. pp: 167.
10. DANIELLS J.; SMITH M.; HAMILL S. 1999. Banana Offtypes An Illustrated Guide. pp:4-8
11. DEBERGH, P.C. and L.J. Maene, 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort. 14: 335-345
12. DEMARLY, Y. Esperimental and theoretical approach of *in vitro* variations. In: Cultivo y Comercialización del Banano. SOTO, M. pp: 700
13. DREW AND SMITH. AUST.J. Exp. Agric. 30: 569-574, 1990. Citado por Domergue, 1990. In: Cultivo Y Comercialización del Banano. SOTO, M. pp: 700
14. EVANS, D.A. and BRAVO, J.E. 1985. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: Zimmerman, R.H. et al. (Eds), Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops. P.73-91.
15. GEORGE, E.F. and SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of comercial laboratories In: propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. pp: 105.
16. GUZMÁN, E. DE; UBALDE, E.M. AND ROSARIO, A.G. Banana and coconut "*in vitro*" cultures for induced mutations studies. Improvement of vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutations. Vienna, Austria, International Atomic Energy Agency. In: Cultivo Y Comercialización del Banano. SOTO, M. pp: 700
17. HARTMANN H.; KESTER D. 1998. Propagación de Plantas. pp: 15.
18. HERNANDEZ, R. 1997. Obtención de plantas libres de patógenos. Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. p 31-43.



19. HU, CV. and J.P. WANG. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture: In: Handbook of Plant Cell Culture. EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V. y YAMEDA, Y. (eds). MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p 177-227.
20. HWANG, S.C. y KO, W.H. 1987. Somaclonal variation of banana and screening for resistance to Fusarium wilt, p 151-156 In G.P. Perley and E. A. De Langhe (eds). Banana and Plantain breeding strategies. Proc. Intl Wkshp., Cairns, AUSTRAL., 13-17 Oct. ACIAR.
21. INIBAP-IPGRI. 1996. Descriptores para el banano. pp: 20.
22. INIBAP-IPGRI. 1998. Annual Report. pp: 41.
23. ISRAELI, Y., REUVENI, O., AND LAHAV, E. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientia horticulturae* 48, p 71-88
24. ISRAELI, Y. And Nimri. 1985. Off-types of banana plants multiplied *in vitro*. In: Report on observations and experiments in bananas in the Jordan Valley in the years 1978-84. 24: 50-59. (in Hebrew)
25. JIMENEZ, E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas. 93 p.
26. KARAMURA D. 1999. Numerical taxonomic studies of the East African Highland bananas (*Musa* AAA-East Africa) in Uganda. pp: 9.
27. KARTHA, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications. In: Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe (ed). New York: Academic Press. p. 181-211.
28. KRIKORIAN, A.D., 1988. Update on tissue culture and somaclonal variation on *Musa* sp. In: Memorias VIII Reunión ACORBAT. Medellín, agosto de 1987. AUGURA; Colombia. Pp. 47-60.
29. KRIKORIAN, A.D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. In: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos teórico prácticos. ROCA, W.M. y MROGINSKI, L.A. (eds). CIAT, Cali, Colombia. p. 95-126.

30. LARKIN, P. J. Y SCOWCROFT, W. R. 1981. Eyespot disease of sugarcane. *Plant Physiol.* 67 408-414
31. LARKIN, P. J. Y SCOWCROFT, W. R., 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
32. LASSOUDIÈRE, A., 1978. Quelques aspects de la croissance et du développement du bananier "Poyo" en Côte d'Ivoire. I. Matériel végétal et méthodes d'études. *Fruits* 33(5): 293-313 In: *Cultivo y Comercialización del Banano*. SOTO, M. pp: 700
33. LAWRENCE, G.H.M., 1951. *Taxonomy of vascular plants*. Macmillan, New York.
34. MA, S. S. AND SHII C. T., 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Chin. Soc. Hort. Sci.* 18: 135-142 In: *Cultivo y Comercialización del Banano*. SOTO, M. pp: 700
35. MURASHIGE, T.Y. SKOOG, F.S. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* (5): 173-197.
36. NOVAK, K.F. 1988. Informe mensual UPEB, Panamá. In *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. pp: 106.
37. ORELLANA, P. 1994. *Tecnología para la propagación in vitro de clones de Musa sp.* Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. 104 p.
38. PÉREZ J.; ORELLANA, P.; JIMÉNEZ, E. y GARCÍA, L. 1998. Empleo de la Biotecnología en el mejoramiento genético de la caña de azúcar In: *propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. pp: 105.
39. PÉREZ J. 1998. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. pp: 105-121.
40. PIERIK, R.L.M., 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Trad. Mateo-Sagsta, L. Mundi-Preñsa, Madrid. 326 p.

41. PURSEGLOVE, J.W., 1972. Tropical crops. Monocotyledons. Vol. 2 Longmans, London.
42. RAM, M; STEWARD, FC., 1962. Growth and development of the banana plant. III. A. The origin of the inflorescence and the development of the flowers. B. The structure and development of the fruit. *Annals of botany* 26 (104): 657-671.
43. REUVENI, O. 1990. Methos for detecting somaclonal variants in "Williams" bananas. In. Identification of genetic diversity in the genus *Musa*. Philippines: Jarret, R., ed., INIBAP. Proceedings of an International workshop held at Los Baños, Philippines (5-10 sept 1988), 211 p.
44. REUVENI ET AL., 1995. Incidence and form of somaclonal variation reported for in vitro propagated bananas and plantains. In: Bananas and Plantains. Gowen S. pp: 167.
45. SAMSON, J.A., 1992. Tropical fruits. 2nd Edition. Tropical Agriculture series References 183 Longmans, London.
46. SANDOVAL, J.A., 1985. Micropropagación de Musáceas. *Revista ASBANA (Costa Rica)*, 24: 21-23.
47. SANDOVAL, J.A., 1991. Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico del CATIE (Costa Rica), 186. 24 p.
48. SHARROCK, S., 1990. collecting *Musa* in Papua New Guinea. In Jarret, R.L. (ed.) Identification of genetic diversity in the Genus *Musa*, pp. 140-157. INIBAP, Montpellier.
49. SIMONDS, N.W. AND SHEPHERD, K., 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas In: Cultivo y Comercialización del Banano. SOTO, M. pp: 700
50. SIMONDS, N.W., 1966. Bananas. 2nd edition. Longmans, London.
51. SIMONDS, N.W., 1973. Los plátanos. Editorial Blume. Barcelona, España. 539 p.

52. SIMONDS, N.W., 1986. Clasificación and Breeding of Bananas In: Banana and Plantain Breeding strategies. ACIAR. Preceeding N° 21. Australia, INIBAP-ACIAR. 69-73 p.
53. SIMONDS, N.W. AND WEATHERUP, S.T.C., 1990. Numerical taxonomy of the wild bananas (*Musa*). *New Phytol* 115: 567-571
54. SMITH, M.K.Y Hamil, S.D. 1994. In Bannana Diseasses in Asia and the Pacific. INIBAP
55. SOTO M. 1998. Cultivo y Comercialización del Banano. pp:194-203
56. STOVER, R.H., 1987. Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and field. In Banana and Plantain Breeding Strategies. ACIAR, Proc N°21: 136-139.
57. STOVER, R.H. AND SIMONDS, N.W., 1987. Bananas, Longman, London.
58. SUBRA, P; GUILLEMOT, J. 1961. Contribution à l'etude du rhizome et des rejets du bananier. *Fruits* 16 (1): 19-23 In: Cultivo Y Comercialización del Banano. SOTO, M.pp: 700
59. VASIL, I.K. 1994. Automation of plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2): 105-108.
60. VILLALOBOS, A. Y GARCÍA, V.A. 1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia*. 48:107-118.
61. VUYLSTEKE, D. Y DE LANGHE, E., 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. In: Cultivo y Comercialización del Banano. SOTO, M.pp: 700
62. VUYLSTEKE, D. & SWENNEN, R. 1990. Somaclonal variation in African plantains. *IITA Research* 1: 4-10
63. WALPOLE, R.; MYERS, R.; MYERS, S. 1999. Probabilidad y estadística para Ingenieros. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. México. Sexta edición. Pg. 752.

Characterisation and early detection of an offtype from micropropagated Lady Finger bananas

M. K. Smith^{AD}, S. D. Hamill^A, V. J. Doogan^B and J. W. Daniells^C

^A Queensland Horticulture Institute, Queensland Department of Primary Industries, Maroochy Research Station, PO Box 5083, Sunshine Coast Mail Centre, Nambour, Qld 4560, Australia.

^B QHI, QDPI, Biometry, Locked Bag No. 4, Moorooka, Qld 4105, Australia.

^C QHI, QDPI, South Johnstone Research Station, PO Box 20, South Johnstone, Qld 4859, Australia.

^D Author for correspondence; e-mail: smithmk@dpi.qld.gov.au

Summary. An offtype has been identified from micropropagated Lady Finger bananas (*Musa* spp., AAB group, Pome subgroup) that is characterised by its slow growth and poor bunch size. Bunch weights were approximately 25% those of normal Lady Finger plants and all of the fruit produced was unmarketable. This particular offtype is the most commonly encountered from micropropagated Lady Finger plants and, in 2 instances, blocks of 3000 and 1500 plants were entirely comprised of this single offtype.

Detection of offtype plants was possible during establishment and growth of plants in the glasshouse by the presence of chlorotic streaks in the leaves. In more severe cases the streaks coalesced into chlorotic patches

that developed thin, necrotic areas that eventually produced holes or splits in the leaves. Symptom expression was not ameliorated by the addition of fertiliser and even though symptoms were similar to severe Ca and B deficiency, both normal and offtype plants had similar levels of these elements in the leaves. The offtype plants were also slow growing in the glasshouse and produced significantly ($P < 0.05$) smaller pseudostems and leaves than normal plants. Offtype plants could be readily detected after 4 weeks deflasking using the presence of chlorotic streaks in the leaves as the main selection criterion. Maximum discrimination was possible between weeks 5–7 and at the 6-leaf stage when all of the offtypes could be detected.

Introduction

Lady Finger bananas (*Musa* spp., AAB group, Pome subgroup) have a well established niche market in Australia, comprising about 5% of Australia's banana production valued at \$16.85 million in 1998. A grower preference for Lady Finger bananas in many cooler, drier parts of Australia, combined with an identified segment of consumer preference within the market, has driven demand for clean planting material. This need for clean planting material is particularly important for Lady Finger growers as it is very susceptible to *Fusarium* wilt, the principal constraint to Lady Finger production in Australia (Pegg *et al.* 1996).

Micropropagated plants have long been recommended as the best source of disease and pest-free planting material (Smith and Drew 1990). Commercial laboratories have been producing micropropagated Lady Finger plants for the industry for over a decade but demand has been constrained because of growers' perceptions of unsatisfactorily

high levels of offtypes. These perceptions are not entirely unfounded as a survey of offtypes in tissue culture plantings in north Queensland in 1991 and 1992 revealed that of 3000 and 1500 Lady Finger plants inspected, respectively, all failed to produce normal plants (Daniells and Williams 1991; Daniells and Bryde 1993). The offtype was characterised by its slow growth, pale green leaves and pseudostem and very poor bunch yield and fruit size.

Our paper compares this low vigour offtype with normal Lady Finger plants and characterises the differences. We initiated cultures of these plants and have followed their development from deflasking through to bunch harvest. We were particularly interested in developing selection criteria that could be used in the nursery so that offtype plants could be recognised and removed by the nursery operator before supply of plants to growers. In this way confidence can be established in the use of micropropagated Lady Finger planting material.

Materials and methods

Experimental procedures and design

Both normal and offtype Lady Finger (*Musa* spp., AAB group, Pome subgroup) suckers were selected from plants that had been grown and characterised in the field at South Johnstone Research Station. These 2 accessions were part of a much larger varietal observation block. Lady Finger was established from suckers and the Lady Finger offtype from micropropagated plants on 7 November 1990. There were 4 plants each of the 2 accessions and the planting arrangement was in single rows at a density of 1333 plants/ha. The trial block received normal industry management practices (Daniells 1984).

Plants were established in culture and grown in the glasshouse using the procedures described by Hamill *et al.* (1993) and Smith and Hamill (1993). Plantlets were deflasked in a sheltered area near the glasshouse. Roots were gently washed free of nutrient agar and planted in seedling trays (28 by 35 cm) containing steam-pasteurised potting mix. The sand-peat (2:1) mixture contained the following nutrients (g/m³) with 3.6 kg/m³ of dolomite: ammonium sulfate (544), superphosphate (184), potassium sulfate (7.2), zinc sulfate (9.6) and iron sulfate (7.2). For experiment 2, sufficient dolomite was added to raise the pH to 5.5 from an initial level of 4.3 (Handreck and Black 1984).

The plants were watered and enclosed in a plastic tent to maintain high humidity. After 1 week, the plastic was gradually opened and by the end of the second week the plants were transferred to 2.5-L planter bags. They were watered as required and for the first 4 weeks were given a fortnightly application of Aquasol at the recommended rate. Osmocote was added to the bags at weeks 4 and 11. In experiment 2, calcium nitrate was applied at 10 g/L with the Osmocote and borax (40 mg) added to each bag at week 4.

The experimental design for glasshouse trials was a randomised block with 5 blocks corresponding to rows and 10 plants in each row. The 10 plants consisted of 2 treatments replicated 5 times and randomly allocated to the 10 positions within each row. The treatments were normal and offtype plants. To minimise edge effects, guard plants were placed in a row around the entire block.

Experiment 1 took place over a 13-week period in the glasshouse before a representative sample of 5 normal and 5 offtype plants were planted in the field at Maroochy Research Station and grown to bunch harvest. This was necessary to verify trueness to type and to eliminate the possibility that further genetic change had occurred during micropropagation. Experiment 2 took place over an 18-week period in the glasshouse. Plants were grown in a glasshouse with fan-forced heaters and evaporative coolers, with daily temperature range 20–32°C.

Measurements

The following measurements were taken from the plants established at South Johnstone Research Station: date of bunch emergence (BE) and harvest (BH), bunch weight, pseudostem height, finger number per bunch, finger diameter for hand 3, finger length for hand 2, total number of leaves and the length: breadth ratio of leaf 5. The measurements were made for both the plant crop and first ratoon.

For the glasshouse studies, measurements commenced when the plants were transferred to the 2.5-L planter bags. The first leaf that emerged after deflasking was labelled with a permanent ink marker and was designated as leaf 1. This served as a reference point for further measurements. Leaf data were obtained from fully

expanded leaves only. Measurements included: height from soil level to the base of the youngest petiole, pseudostem diameter at the base of the plant; petiole length from the point where the petiole adjoins the pseudostem to the base of the lamina; lamina length and lamina width one-third of the way along the length of the lamina.

Symptom severity on leaves was rated on a scale of 1–5: 1, large chlorotic areas with holes and splits in the leaves; 2, chlorotic patches with some thinning and necrosis; 3, chlorotic streaks; 4, chlorotic spots few in number; 5, no symptoms.

Height, pseudostem diameter, leaf number and leaf symptoms were recorded weekly. Leaf measurements and nutrient analyses were made at the end of the glasshouse evaluation.

Boron and calcium analysis

The youngest fully expanded leaf was removed from each plant and oven dried at 70°C for 48 h. After drying, the leaves were ground using a hammermill grinder fitted with a 1 mm sieve. Ground leaf subsamples weighing 0.5 g were placed into crucibles for dry ashing at 500°C for 6 h. The ashed material was then dissolved in 1 mol/L HCl and analysed for boron and calcium using an Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer (ICPAES).

The boron and calcium status of leaf samples was evaluated using the levels reported by Reuter and Robinson (1986); where <10 mg B/g was regarded as deficient, 10–20 mg B/g marginal and 20–80 mg B/g adequate; while <0.5% Ca was regarded as deficient, 0.5–0.7% Ca marginal and 0.8–1.2% Ca as adequate.

Virus indexing

Plants were indexed for banana bunchy top virus (BBTV) by triple antibody sandwich ELISA (Thomas and Dietzgen 1991) and for cucumber mosaic virus (CMV) by biotin/streptavidin indirect ELISA (Thomas 1991). Plants were inspected by a virologist and were also examined by electron microscopy of partially purified miniprep extracts designed to detect rod-shaped and isometric virus particles (adapted from Diekmann and Putter 1996).

Statistical analysis

The statistical software package GENSTAT was used for all analyses. Repeated measures analysis of variance was used to compare the 2 treatments over time for pseudostem height and diameter. All other data were analysed by analysis of variance, with the exception of the field trial where means and standard errors were recorded. Where appropriate, pair-wise testing between treatments was done using *t*-s.d. at *P* = 0.05 and 0.01.

Results

A Lady Finger offtype was identified from micropropagated planting material and compared with normal Lady Finger in the field at South Johnstone Research Station (Table 1). The offtypes were initially of a paler green appearance, although no obvious leaf symptoms were noted. The offtypes grew and developed at a slower rate, both a slower leaf emergence rate (data not presented) and a greater number of leaves emerged prior to bunch emergence, than normal Lady Finger plants. However, at bunch emergence the offtype and normal plants were of a similar height with leaves of similar size and appearance. Bunch emergence and

Table 1. Plant and bunch characteristics of Lady Finger and Lady Finger offtype at South Johnstone Research Station

Lady Finger was established from suckers and the Lady Finger offtype from micropropagated plants on 7 November 1990
 P, planting; BE, bunch emergence; BH, bunch harvest; H3, hand 3; H2, hand 2
 Values are the means of 4 plants; standard errors are in parentheses

Character	Plant crop		Ratoon 1	
	Normal	Offtype	Normal	Offtype
Bunch weight (kg)	17.0 (6.2)	3.8 (0.3)	14.5 (2.4)	4.8 (2.1)
Days (P to BE)	262 (59)	427 (124)	510 (108)	940 (110)
Days (P to BH)	446 (37)	679 (96)	689 (108)	1115 (103)
Pseudostem height (cm)	318 (18)	311 (8)	384 (6)	373 (35)
Finger number/bunch	95 (17)	88 (20)	101 (4)	87 (11)
Finger diameter H3 (cm)	4.25 (0.47)	2.78 (0.28)	3.90 (0.23)	2.89 (0.07)
Average finger weight (g)	156 (38)	40 (7)	30 (27)	47 (16)
Finger length H2 (cm)	18.3 (2.0)	9.8 (0.3)	17.7 (1.8)	10.9 (1.2)
Total leaf number	38.5 (3.4)	46.3 (4.4)	n.a.	n.a.
Leaf 5 (length: breadth)	3.4 (0.1)	3.3 (0.4)	3.8 (0.3)	3.5 (0.4)

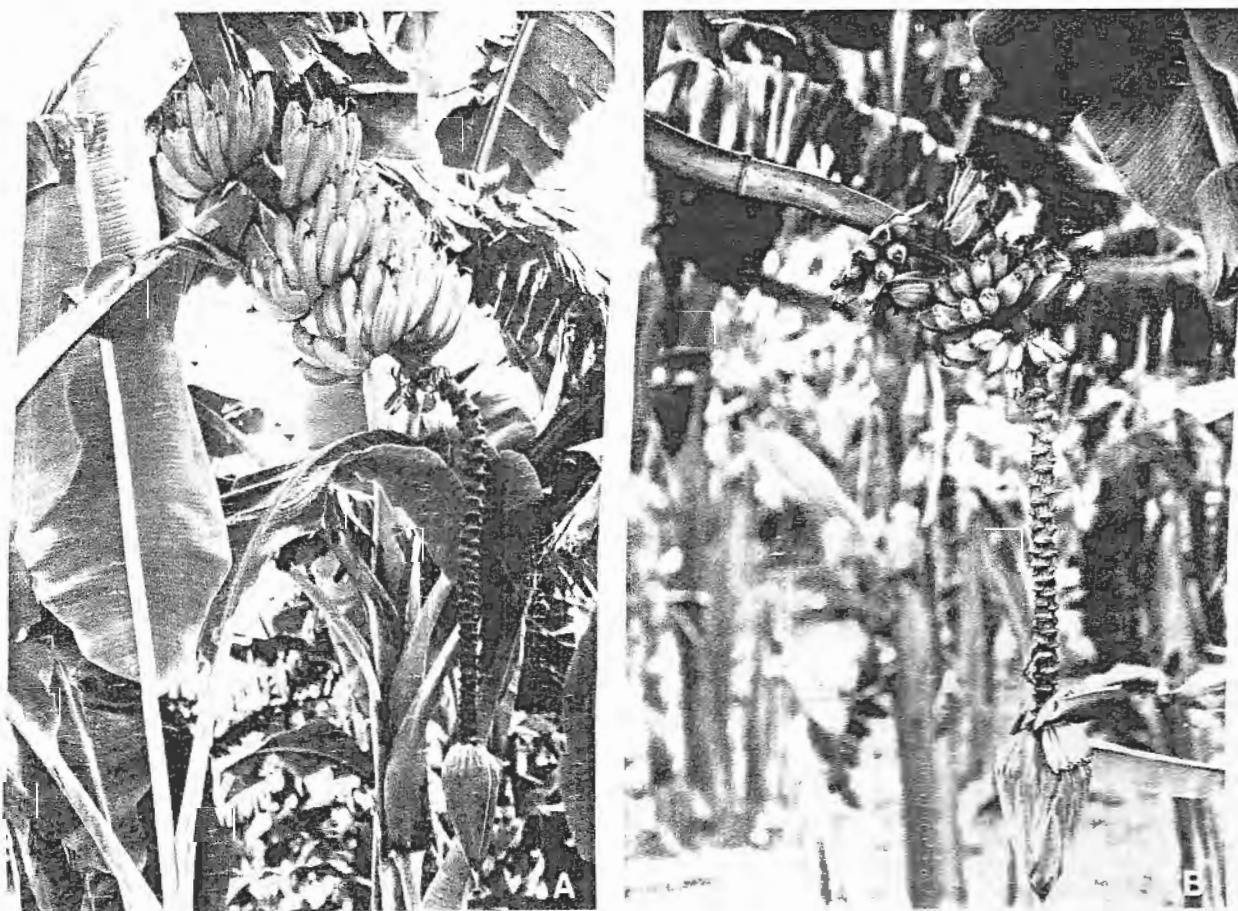


Figure 1. Comparison of (a) a normal Lady Finger bunch with (b) a Lady Finger offtype bunch.

Table 2. Leaf characteristics of micropropagated Lady Finger and Lady Finger offtype grown under glasshouse conditions
Leaves were measured from 17-week-old plants from experiment 1

Values are the means of 18–25 replicates; l.s.d. values at $P = 0.05$; n.s., not significant
N, Lady Finger; O, Lady Finger offtype

Leaf number	Leaf length (cm)			Leaf width (cm)			Petiole length (cm)		
	N	O	l.s.d.	N	O	l.s.d.	N	O	l.s.d.
Leaf 6	21.4	18.6	1.13	8.3	7.1	0.62	3.9	2.5	0.34
Leaf 7	24.9	21.7	1.29	10.0	8.9	0.56	3.9	2.9	0.38
Leaf 8	28.7	26.2	1.53	11.5	10.9	0.61	4.7	3.5	0.38
Leaf 9	33.3	31.2	1.66	13.5	12.9	0.59	5.3	4.3	0.49
Leaf 10	37.0	36.5	n.s.	14.6	14.2	n.s.	6.2	5.3	0.48

Lady Finger plants exhibit the more extreme symptoms encountered in the offtype plants. These leaf symptoms were the most obvious and characteristic feature of the Lady Finger offtypes.

These symptoms were thought to be similar to Ca or B deficiency in banana, and leaf nutrient analyses were made from 17-week-old plants in pots from experiment 1. However, no significant differences were seen between normal and offtype plants, with Ca levels of 0.30% and 0.34% and B measuring 15.2 mg/g and 14.2 mg/g, respectively.

The experiment was repeated with additional fertiliser treatments and significant ($P < 0.05$) differences were once again seen between normal and offtype plants with the offtypes being smaller, thinner and with a greater severity of symptom development than the normal plants (Table 3). No significant differences were seen with B and Ca levels in the leaves between offtype and normal plants, even with the addition of these elements to the plants. The expression of leaf symptoms was again the most useful feature for discriminating between Lady Finger offtypes and normal plants during glasshouse evaluation.

Table 3. Plant characteristics of micropropagated Lady Finger and Lady Finger offtype grown under glasshouse conditions

Leaves were measured on 18-week-old plants from experiment 2
Severity rating on the first fully expanded leaf on a scale of 1–5: 1, leaf with chlorotic patches and necrotic lesions with leaf deformation; 5, no symptoms

Character	Normal	Offtype	l.s.d. ($P = 0.05$)
Pseudostem height (cm)	45	41	3.3
Pseudostem diameter (cm)	3.1	2.7	0.24
Symptom severity	4.8	2.8	0.41
Leaf boron (mg/g)	9.32	8.97	n.s.
Leaf calcium (%)	0.31	0.30	n.s.

The leaves did not exhibit typical virus symptoms and no virus particles were detected after miniprep purification. The plants tested negative to CMV and BBTv by ELISA serology.

The normal and offtype plants grown in the field at Maroochy Research Station displayed similar characteristics to those mother plants grown at South Johnstone Research Station, confirming that no further genetic variation occurred during culture establishment and multiplication. The Lady Finger offtypes at MRS were slow growing with poor bunch characteristics.

Discussion

Lady Finger offtypes characterised by slow growth and poor yield in the field (Table 1) could be readily distinguished from normal micropropagated Lady Finger plants in the glasshouse. They also had a slower growth rate and were characterised as small, thin plants with leaves and petioles that were smaller than normal plants (Fig. 2, Table 2). However, the most characteristic feature, and the one a nursery operator could use for detecting these offtypes, was the presence of chlorotic streaks in the leaves. As symptom severity increased, these streaks coalesced to form chlorotic patches and eventually thin, necrotic areas developed to form holes and tears in the leaves (Fig. 4). The progression of these symptoms could not be alleviated by the addition of fertiliser, and Ca and B analyses of the leaves revealed no significant differences between normal and offtype plants (Table 3). The best time to select these offtypes was between 4–8 weeks after deflasking. However, maximum discrimination was possible between weeks 5 and 7 and at the 6-leaf stage. All of the offtypes could be detected at this stage while from 4 to 12% of the normal plants could also be recognised as offtypes on the basis of leaf symptoms. These chlorotic spots or flecks are present on the leaves of normal plants (even in the field)

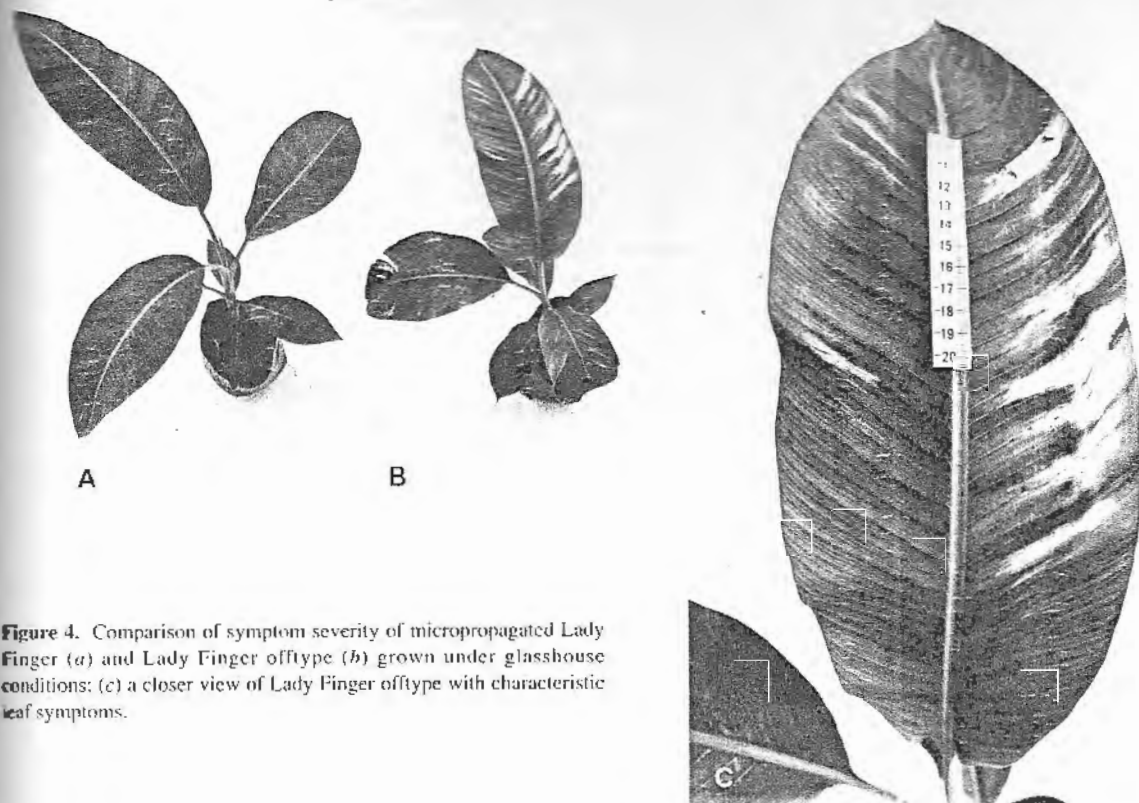


Figure 4. Comparison of symptom severity of micropropagated Lady Finger (*a*) and Lady Finger offtype (*b*) grown under glasshouse conditions; (*c*) a closer view of Lady Finger offtype with characteristic leaf symptoms.

and can add to uncertainty over identification of offtype plants; however, they need not be confused with the long chlorotic streaks and more severe symptoms associated with the offtypes.

It was interesting that leaf symptoms diminished once plants were planted in the field, and although the offtypes were generally paler green and extremely slow growing, it was not until bunch emergence that growers would see the serious consequences of this offtype. Offtypes produced very small bunches of unmarketable fruit and so it is important that these offtypes are removed before micropropagated plants are sold to growers.

There are a number of strategies that tissue culture laboratories can use to minimise the occurrence of offtypes (Israeli *et al.* 1995; Damasco *et al.* 1998). Nurseries also have strategies for minimising the impact of offtypes on the farm. For instance, nurseries will often supply growers with a cross-section of plants from a number of micropropagated lines to prevent an individual grower receiving all the plants from a single line that may have associated offtype problems.

Nurseries continue to be the last line of defence when it comes to protecting growers from offtypes. They require reliable guides for the identification of some of the major offtypes they are likely to encounter.

This paper has characterised a major offtype frequently seen in micropropagated Lady Finger plants and has identified traits that can be used to detect it in the nursery. By removing offtypes before their sale to growers, nurseries can ensure that only the best quality plants are released to industry. This will help establish confidence in the use of micropropagated Lady Finger planting material.

Acknowledgments

We thank T. Smith for help and advice with B and Ca analyses at the University of Queensland as well as J. Thomas and A. Kessling, QDPI, for indexing and inspecting the plants for viruses. The financial support of the Queensland Banana Industry Protection Board, the Banana Industry Committee of New South Wales and the Horticultural Research and Development Corporation is gratefully acknowledged.

References

- Damasco, O. P., Adkins, S. W., Godwin, I. D., and Smith, M. K. (1998). Use of a SCAR-based marker for the early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. *Acta Horticulturae* **461**, 157-64.
- Daniells, J. W. (1984). The banana industry in north Queensland. *Queensland Agricultural Journal* **110**, 282-90.
- Daniells, J. W., and Bryde, N. J. (1993). Results of survey of offtypes in tissue culture plantings—1992. *Bananatopics* **19**, 4.
- Daniells, J. W., and Williams, R. C. (1991). Results of survey of offtypes in tissue culture plantings—1991. *Bananatopics* **16**, 6.
- Diekmann, M., and Putter, C. A. J. (1996). 'FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm.' No 15. *Musa*. 2nd Edn. (Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Plant Genetic Resources Institute: Rome.)
- Hamill, S. D., Sharrock, S. L., and Smith, M. K. (1993). Comparison of decontamination methods used in initiation of banana tissue cultures from field-collected suckers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**, 343-6.
- Handreck, K. A., and Black, N. D. (1984). 'Growing Media for Ornamental Plants and Turf.' (New South Wales University Press: Kensington, Australia.)
- Israeli, Y., Lahav, E., and Reuveni, O. (1995). *In vitro* culture of bananas. In 'Bananas and Plantains', (Ed. S. Gowen.) pp. 47-78. (Chapman and Hall: London.)
- Pegg, K. G., Moore, N. Y., and Bentley, S. (1996). Fusarium wilt of bananas in Australia: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* **47**, 637-50.
- Reuter, D. J., and Robinson, J. B. (1986). 'Plant Analysis: an Interpretation Manual.' (Inkata Press: Melbourne, Australia.)
- Smith, M. K., and Drew, R. A. (1990). Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**, 267-89.
- Smith, M. K., and Hamill, S. D. (1993). Early detection of dwarf off-types from micropropagated Cavendish bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **33**, 639-44.
- Thomas, J. E. (1991). Virus indexing procedures for banana in Australia. In 'Banana Diseases in Asia and the Pacific'. Proceedings of a technical meeting on diseases affecting banana and plantain in Asia and the Pacific. Brisbane, Australia, 15-18 April 1991. (Eds R. V. Valmayor, B. E. Umali and C. P. Dejosano.) pp. 144-57. (International Network for the Improvement of Banana and Plantain: Montpellier, France.)
- Thomas, J. E., and Dietzgen, R. G. (1991). Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *Journal of General Virology* **72**, 217-24.

Received 25 June 1999, accepted 8 October 1999



A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas.

M.K. SMITH*

A REVIEW OF FACTORS INFLUENCING THE GENETIC STABILITY OF MICROPROPAGATED BANANAS.

M.K. SMITH.

Fruits, Apr. 1988, vol. 43, n° 4, p. 219-223.

ABSTRACT - The occurrence of off-types (somaclonal variants) from micropropagated bananas is of concern to the banana industry throughout the world. Somaclonal variation is influenced by both intrinsic factors, such as the genetic stability of the cultivar or genotype being micropropagated, and extrinsic or culture-induced factors. Genetic changes induced during the process of tissue culture can be influenced by the choice of explant, the choice of culture medium (particularly the nature and concentration of phytohormones), the period spent in culture and the degree of dedifferentiation the tissues undergo in culture. Strategies for minimizing somaclonal variation from micropropagated bananas are proposed.

UNE REVUE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA STABILITÉ GÉNÉTIQUE DES BANANIERS ISSUS DE MICROPROPAGATION.

M.K. SMITH.

Fruits, Avril 1988, vol. 43, n° 4, p. 219-223.

RESUME - L'apparition de variants somaclonaux parmi des bananiers obtenus de micropropagation intéresse la production de cette espèce dans le monde entier. La variation somaclonale est influencée tant par des facteurs intrinsèques tels que la stabilité génétique du cultivar ou le génotype que par d'autres, extrinsèques liés à la culture. Les modifications génétiques peuvent dépendre du choix de l'explant, du milieu de culture (nature et concentration en phytohormones), de la durée de celle-ci et du degré de dédifférenciation des tissus. On propose des méthodes pour réduire la variation somaclonale.

INTRODUCTION

The technique for the establishment of banana plants from excised shoot tips was first reported by Ma and Shii (1972) and has been further modified by Hwang *et al.* (1984) and Cronauer and Krikorian (1984) for the rapid *in vitro* propagation of bananas. One of the major features of the technique, as it is now used, is that multiplication can be induced by releasing dormant buds at the leaf bases of the explants. Subculture from the proliferating mass of shoots which results ensures a steady and rapid rate of increase.

Commercial laboratories are currently producing banana plants using *in vitro* propagation techniques for industry plantations in Taiwan, Jamaica, Israel, South Africa and Australia. With the field establishment of these plants, reports of a large percentage of off-types (variants) in the population have surfaced. Variability has ranged from 3% in Taiwan (Hwang and Ko, 1986), 9% in Israel (Reuveni

et al., 1984), 21% in Australia (Kebby, 1987) to 25% in Jamaica (Stover, 1986). Table 1 lists the off-types that have been observed in Australia and overseas. Dwarfism is by far the most common off-type observed amongst Cavendish clones.

This high incidence of off-types from micropropagated bananas is of concern to the industry, not only in Australia but worldwide. This review attempts to identify those factors that may be influencing the variation observed in micropropagated bananas and outlines some of the steps that are being taken by the Australian industry to minimize this variation. Areas in need of further research are indicated. Particular attention is given to the problem of dwarf off-types.

FACTORS INFLUENCING SOMACLONAL VARIATION

It is now firmly established that genetic changes can occur during the process of tissue and cell culture. Many of these changes are 'locked' into the genome of the regenerated plants and can therefore be transferred to successive generations. This phenomenon, called somaclonal variation,

* - Research Horticulturist - Department of Primary Industries
Maroochy Horticultural Research Station - P.O. Box 5083 - Sunshine
Coast Mail Centre Nambour, Qld, Australia 4560.

TABLE 1 - Somaclonal variants encountered from micropropagated Cavendish clones.

Stature	a.	Various degrees of dwarfism. Choking sometimes occurs when throwing a bunch. The peduncle is much shorter and hands packed much closer to each other on the stem than normal.
	b.	Miniature plants with thin pseudostems, fewer hands and long tapering bunches.
	c.	Giantism. Excessively tall plants with long distance between the point of leaf emergence.
Foliage.	a.	Narrow drooping leaves ; characteristic of tetraploids (an extra set of chromosomes).
	b.	Variegated leaves (shades of yellow and pale green) sometimes resembling «mosaic».
	c.	Waffled or wavy edges of leaf with changes in leaf thickness.
	d.	Increased waxiness.
Pseudostem.	a.	The pseudostem, petiole and midrib turns black after bunch emergence.
	b.	Purple-black pseudostem.
	c.	Greenish pseudostem, petioles and midribs.
Bunch.	a.	Small bunches with short fingers. The leaves are dark pigmented and droop over.
	b.	Hairy fruit.
	c.	Narrow and elongate male bud.

can be defined as genetic variability generated during tissue culture (Larkin and Scowcroft, 1981).

This variation can involve point mutations, at one end of the spectrum, to gross ploidy changes at the other end. Variability is most likely the result of both intrinsic factors, such as the genetic stability of the particular cultivar or genotype under investigation, and genetic alterations induced during the process of tissue culture (Ammirato *et al.*, 1984). Scowcroft (1984) and George and Sherrington (1984), after reviewing the available literature on genetic variation in plants propagated through tissue culture, summarized the following factors as being known to influence the level of somaclonal variation observed in plants :

- 1) If callus formation is a significant phase in the propagation cycle, then it can be expected that plants will show a higher level of somaclonal variation than those that do not undergo an intervening callus phase of growth.
- 2) The frequency of somaclonal variants among plants propagated through tissue culture increases with prolongation of the culture period.
- 3) Asexually-propagated species can be expected to display a higher frequency of somaclonal variation than seed-propagated species.
- 4) Some genotypes are more prone to genetic instability than others and this can be highlighted during tissue culture propagation.
- 5) The composition of the culture medium, particularly the nature and concentration of plant growth regulators used in the medium, may lead to genetic changes in

tissue culture-propagated plants.

Taking each of these main points in turn :

Culture Mode.

Scowcroft (1984) has ranked tissue culture systems in order from low to high for genetic instability as follows: micropropagation from isolated buds and meristems, adventitious shooting, somatic embryogenesis and organogenesis from callus, cells and cultured protoplasts. Because banana micropropagation involves the release of dormant buds at the leaf bases of the explants, then callus formation does not occur under the culture conditions outlined by Hwang *et al.* (1984) and Cronauer and Krikorian (1984). Should commercial laboratories use a combination of phytohormones that encourage a dedifferentiated callus growth phase prior to shoot multiplication, then somaclonal variation may be enhanced.

Micropropagation from isolated buds and meristems would provide the best option to minimize somaclonal variation and this is the recommended system used in propagating bananas in culture. However variation in micropropagated plants does occur. Swartz *et al.* (1981), using rapid propagation from stolon meristem tips of strawberry, evaluated some 500 plants from each of three cultivars. Variant plants were found including runnerless and female-sterile types and those with compact trusses. Dwarf variants comprised 1.2% of the total population.

Reports on plants produced by micropropagation rarely report the actual level of variation. Defined research is needed to establish the level of variation in micropropagation plants in comparison to that found as a consequence of somatic embryogenesis and organogenesis from callus.

Period spent in Culture.

Prolonged periods of tissue culture are known to result in an increased frequency of gross chromosomal aberrations (Meins, 1983). Also the frequency of somaclonal variants among plants regenerated from tissue culture also increases with length of time in culture, being more of a problem in plants regenerated from callus and cell cultures than in micropropagated plants.

In addition, if a variant should arise and go undetected through successive subcultures, the impact of a single off-type is magnified. Therefore if a dwarf variant arises early in the culture cycle then subsequent subcultures will increase its numbers significantly. Hence the culture technique as well as genetic change contributes to the problem. Should the variant multiply faster but not be readily identified the culture technique becomes the dominant factor.

Sexual versus Asexual Species.

With seed development, in sexually-reproducing species, the normal processes of meiosis and fertilization will eliminate chromosomal abnormalities in favour of those gametes with the 'normal' chromosome complement. Banana, being a sterile triploid, is able to conserve its unique genome only through asexual vegetative propagation. Occasionally 'sports' or off-types arise naturally. The process of micropropagation apparently increases the frequency of these off-type events.

Genotype.

Limited evidence indicates that the genotype of the mother plant has a significant effect on the extent of variation generated during culture. In strawberry, cultivar differences occur in the frequency of off-type plants (Swartz *et al.*, 1981). Among plants derived by adventitious shoot formation from leaf explants of *Begonia x hiemalis*, Roest *et al.* (1981) found that in one cultivar 43% of regenerants were variant (colour, size and form of leaves and flowers) whereas for another cultivar only 7% were variant.

A similar problem may exist with banana cultivars as some genotypes have yielded a higher percentage of dwarf off-types than other genotypes (Table 2). More research is needed to help resolve this issue as multiplication from genetically stable genotypes would be preferred.

Media Composition.

Scowcroft (1984) states that tissue culture media and growth regulators appear not to be mutagenic *per se*. He bases this on the mutagenic assay using the *Tradescantia* stamen hair system developed by Grant and Zura (1982) which has been developed as a sensitive system for studying somatic mutations resulting from ionizing radiation or chemical mutagenesis. Dolezel and Novak (1984) tested for the mutagenic effect of a wide range of phytohormones and found no somatic mutation rate significantly greater than the spontaneous rate.

It can be argued that if a particular hormone induces dedifferentiation of plant tissues, then it is the dedifferentiation process and its maintenance that can cause genetic instability and not the hormone itself. Similarly the culture medium may act to increase the proportion of genetically abnormal cells that appear or are already present in an explant by differentially influencing their rate of division.

George and Sherrington (1984) state that the use of high concentrations of auxins and cytokinins in culture media can result in plants being morphologically different from normal plants. In most cases these involve physiological or epigenetic changes that are reversible. In other words the plants can 'grow out' of their particular abnormality after being transferred to soil. In some cases, however, cytokinins have been implicated in causing genetic changes (George and Sherrington, 1984). A better understanding of the causes of aberration would be useful in developing strategies for circumventing them. For example, if a connection between high levels of synthetic growth regulators and the appearance of phenotypic aberrations can be established then modifications of the types of growth regulators used can be instituted.

STRATEGIES FOR MINIMIZING SOMACLONAL VARIATION IN MICROPROPAGATED BANANAS

Having examined the factors that can influence variation in micropropagated bananas, it is useful to identify the following possible strategies to minimize this variation.

- 1) Commercial laboratories involved with micropropagating bananas for the industry should be made aware of the potential incidence of, and the factors that influence somaclonal variation. Advice would be given of the methods of identifying high risk growth characteristics *in vitro* and strategies for minimizing these problems. Such 'feedback' should modify work practices that may

TABLE 2 - Tissue culture planting survey ; July 1986. The number and percentage of dwarf off-types by clone.

Cavendish cv. Williams Clone	Number of Plants	Number of Off-types	% Off-types
C3	1068	339	31.7
C2	211	13	6.2
C5	336	14	4.1
C7	414	67	16.0
C26	101	11	10.9
Total	2130	444	20.8

be contributing to excessive off-types occurring in commercial plant batches.

- 2) Because the culture medium, particularly the nature and concentrations of phytohormones used in the culture medium, may contribute to the production of off-types it is necessary to determine a lower limit of phytohormones concentration where multiplication is possible but the production of off-types is minimized. The use of 5 mg l⁻¹ BAP (benzyl amino purine) for shoot multiplication is widely used (Cronauer and Krikorian, 1984; Jarret *et al.*, 1985; Gupta, 1986) however good multiplication is also possible for a range of cultivars at half this concentration (ie. 2.5 mg l⁻¹ BAP, Wong, 1986). Further research is needed in this area. In the meantime BAP concentrations in the range of 2-2.5 mg l⁻¹ is recommended for banana multiplication.

The use of any combination of phytohormones that cause the tissues to dedifferentiate to form callus should be discontinued.

- 3) It has been suggested that cultures initiated from floral apices (bells) show a greater percentage of off-types than from sucker-derived apices. The basis of this concern is commercial experience in Australia, but no comparative testing under controlled experimental conditions has been done. Until such work is done it is recommended that cultures be initiated from vegetative apices of suckers and that bell-derived plants should be omitted from collections geared towards multiplication of plants for the industry.
- 4) It is important to remember that both the frequency of genetic events leading to off-types and the proportion of off-types multiplied in culture will increase with time.

Hwang (*pers. comm.*) states that they have been successful in limiting the incidence of off-types to 3% and this is attributable, in part, to limiting multiplication to no more than 20 000 plants per initial explant. If more plants are to be produced then a proportionate number of suckers are necessary from which to initiate lines. Reuveni (*pers. comm.*) takes a more conservative approach and says the limit should be no more than 1 000 plants per initial explant. Clearly some work is necessary to establish the upper limits and the cooperation of commercial laboratories would be invaluable in making this sort of assessment possible.

Commercial laboratories may wish to consider a programme where important clones are regularly re-initiated from suckers to ensure genetic uniformity. Alternatively the laboratories may wish to consider a programme where important clones are maintained in a slow-multiplication cycle (ie. low to no phytohormones) to keep a healthy stock of material to draw upon for periods of rapid increase. At this point in time the former approach is recommended and the latter is a goal to aim for once a greater understanding of the incidence of off-types has developed.

- 5) The occurrence of off-types in the field should be carefully monitored. Good records are also necessary at all

stages of the multiplication, hardening-off and field establishment process. It is important to be able to trace the origin of the plant nursery through to the tissue culture laboratory for each specific planting. Coupled with this must be the ability to trace batches of plants and their history of treatment through each process by well kept and standardised records. This should help to identify any problem areas and to remedy the situations which arise efficiently.

- 6) Commercial laboratories should rogue any off-type plants at the culture level and nurseries should rogue prior to field planting. Only morphologically normal plants should be permitted to be planted in the field. This will eliminate many of the thin-leaved off-types, variegated leaf off-types and other morphologically aberrant plants.

Dwarfs will continue to be a problem in Cavendish clones until a more reliable screening and selection procedure is found and implemented. The off-type problem in Australia can largely be attributed to the fact that little or no selection was practised at either the culture or nursery level. Dwarfs which are difficult to separate from normal plants at a young age mostly went undetected and showed themselves in the field just prior to bunch emergence.

Taiwanese experience suggests that subtle differences in leaf and pseudostem morphology can be selectively applied at the nursery level to rogue dwarf off-types (Hwang, *pers. comm.*). A trial is currently underway to define and determine if morphological markers can be used in the Williams cultivar to distinguish dwarfs from normal plants under the conditions existing at QBan nurseries (industry-certified). Selected and normal plants require field evaluation to determine if a roguing technique based on morphology has any merit under Australian conditions.

Recent work by Reuveni and colleagues in Israel suggests that biochemical markers may be used to distinguish dwarf from normal plants at the culture level. Studies of this nature may have increasing relevance in the absence of a system based on morphological markers.

Until a reliable screening and selection programme is developed, dwarf off-types will continue to be observed in field plantings.

Dwarf off-types represent both a problem and a challenge. A major problem is the long lag-time from culture initiation to final detection of many off-types in the field. A time frame that involves several years. The above guidelines represent some of the strategies for minimizing the problem. The challenge lies in both developing suitable cultural practices to minimize the formation of dwarf off-types and in developing appropriate screening and selection techniques to detect dwarf off-types as early in the propagation chain as possible, and definitely before they reach the field. The above guidelines can be implemented, however several years of further research and development are necessary to improve culture and off-type screening

techniques to establish at what level of confidence a commercial banana tissue culture propagation scheme can operate.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Rod Drew, QDPI; Mark Panitz, COD; and Jim Munday, Gaincover Laboratories for useful comments and discussion.

REFERENCES

- AMMIRATO (P.V.), EVANS (D.A.), FLICK (C.E.), WHITAKER (R.J.) and SHARP (W.R.). 1984. Biotechnology and agricultural improvement. *Trends Biotech.*, 2, 53-58.
- CRONAUER (S.) and KRİKORIAN (A.D.). 1984. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. *HortScience*, 19, 234-235.
- DOLEZEL (J.) and NOVAK (F.J.). 1984. Effect of plant tissue culture media on the frequency of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. *Z. Pflanzenphysiol.*, 114, 51-58.
- GEORGE (E.F.) and SHERRINGTON (P.D.). 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and Directory of Commercial laboratories. *Exegetics Ltd., Basingstoke, England*.
- GRANT (W.F.) and ZURA (K.D.). 1982. Plants as sensitive *in situ* detectors of atmospheric mutagens. In: *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Ed. HEDDIE (H.A.) Academic Press, New York, p. 407-434.
- GUPTA (P.P.). 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6, 33-39.
- HWANG (S.C.), CHEN (C.L.), LIN (J.C.) and LIN (H.L.). 1984. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. *HortScience*, 19, 231-233.
- HWANG (S.C.) and KO (W.H.). 1987. Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to *Fusarium* Wilt. In: *Banana and Plantain Breeding Strategies: Proceedings of an International workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October, 1986*. Eds. PERSLEY (G.J.), and DELANGHE (E.A.) *ACIAR Proceedings* No 21, p. 151-156.
- JARRET (R.L.), RODRIGUEZ (W.) and FERNANDEZ (R.). 1985. Evaluation, tissue culture propagation, and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. *Scientia Hort.*, 25, 137-147.
- KEBBY (B.). 1987. Report on tissue culture off types in North Queensland. *Bananatopics*, 7, 14.
- LARKIN (P.J.) and SCOWCROFT (W.R.). 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genetics*, 58, 197-214.
- MA (S.S.) and SHU (C.R.). 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.*, 18, 135-142.
- MEINS (F.). 1983. Heritable variation in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34, 327-346.
- REUVENI (O.), ISRAELI (Y.), DEGANI (H.) and ESHDAT (Y.). 1984. Genetic variability in banana plants multiplied via *in vitro* techniques. *Proc. International Board for Plant Genetic Resources Meeting, Leuven, University, Belgium*.
- ROEST (S.), VAN BERKEL (M.), BOKELMANN (G.) and BROERTJES (C.). 1981. The use of an *in vitro* adventitious bud technique for mutation breeding of *Begonia hiemalis*. *Euphytica*, 30, 381-388.
- SCOWCROFT (W.R.). 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. *IBPGR Report 184/152*.
- STOVER (R.H.). 1987. Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and field. In: *Banana and Plantain Breeding Strategies. Proceedings of an International workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October 1986*. Eds. PERSLEY (G.J.) and DELANGHE (E.A.) *ACIAR Proceedings* No. 21, p. 136-139.
- SWARTZ (H.J.), GALLETTA (G.J.) and ZIMMERMAN (R.H.). 1981. Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sc.*, 106, 667-673.
- WONG (W.C.). 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6, 159-166.

ÜBERSICHT DER EINFLUSSFAKTOREN DER GENETISCHEN STABILITÄT VON BANANENPFLANZEN, DIE DER MIKROSKOPISCHEN VERMEHRUNG ENTSTAMMEN.

M.K. SMITH.

Fruits, Apr. 1988, vol. 43, nº 4, p. 219-223.

KURZFASSUNG - Die im Wege der mikroskopischen Vermehrung gezüchteten, somaklonalen Varianten der Banane sind für die Produktion dieser Spezies in der ganzen Welt von Interesse. Die somaklonale Variation wird von endogenen Faktoren wie genetische Stabilität der Zuchtsorte bzw. des Genotyps, sowie von exogenen, anbaurelevanten Parametern beeinflusst. Für die genetischen Modifikationen mögen folgende Gesichtspunkte bestimmend sein: Wahl des Explantats, Zuchtmedium (Natur und Konzentration an Pflanzenwachststoffen), Zuchtdauer und Entdifferenzierungsgrad der Gewebe. Zur Reduzierung der somaklonalen Variation werden einschlägige Methoden vorgelegt.

UNA REVISTA DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTABILIDAD GENETICA DE LOS BANANOS PROCEDENTES DE MICROPROPAGACION.

M.K. SMITH

Fruits, Apr. 1988 vol. 43 nº 4, p. 219-223.

RESUMEN - La aparición de variantes somaclonales entre bananos obtenidos de micropropagación interesa a la producción de esta especie en el mundo entero. La variación somaclonal está influenciada tanto por factores intrínsecos como la estabilidad genética del cultivar o el genotipo como por otros, extrínsecos ligados al cultivo. Las modificaciones genéticas pueden depender de la elección del explante, del medio de cultivo (naturaleza y concentración en fitohormonas), de la duración de éste y del grado de diferenciación de los tejidos. Se proponen métodos para reducir la variación somaclonal.

MS Smith

Early detection of dwarf off-types from micropropagated Cavendish bananas

M. K. Smith and S. D. Hamill

Queensland Department of Primary Industries, Maroochy Horticultural Research Station, PO Box 5083, SCMC, Nambour, Qld 4560, Australia.

Summary. A method was developed for early detection of dwarf off-types from micropropagated bananas (*Musa* sp., AAA Group, Cavendish subgroup). Selection of dwarfs was from glasshouse-grown plants, and although differences between dwarf and normal plants could be detected as early as 3 weeks from deflasking, discrimination was most effective at week 7, when the normal plants had reached a height of 18–20 cm. In order to develop selection criteria, known dwarf off-types and normal plants were micropropagated and established in a glasshouse. Measurements included plant height, petiole length, lamina length and width, and distance between leaves. Petiole length, lamina length, and the petiole to lamina length ratio provided the most promising selection criteria, with the dwarfs having significantly ($P < 0.01$) smaller petioles and leaves than the normal plants.

Selection was most effective when the plants were growing vigorously and uniformly. When growth became limiting, selection was more difficult. This was particularly apparent in plants that required repotting into larger containers and in micropropagated bananas grown in nurseries under suboptimal conditions.

Plants were grown in the field and observed at bunch emergence, to verify trueness to type and to eliminate the possibility that off-types may have arisen in the normal and dwarf populations. A survey of these selection criteria with other Cavendish cultivars of various statures was also completed and the results suggest that dwarf and extra-dwarf off-types could be readily separated from the taller Cavendish cultivars Williams, New Guinea Cavendish, and Grande Naine.

Introduction

The banana industry is interested in the use of micropropagated bananas as a source of planting material. Micropropagated bananas offer the following advantages: freedom from pests and diseases; rapid multiplication; the potential for highly uniform growth and bunch harvest; 100% establishment following planting. They also show higher yields with greater productivity than plants obtained from conventional propagules of planting material such as suckers and 'bits' (Drew and Smith 1990). The frequent occurrence of off-types has, however, prevented wide-spread industry acceptance of micropropagated bananas.

The dwarf off-type is one of the most common in micropropagated Cavendish cultivars (Daniells and Smith 1991; Israeli *et al.* 1991). The dwarf off-type is characterised not only by its short stature but also by short finger length, closely packed hands, bract retention, and a tendency to choke under adverse environmental conditions (Smith and Drew 1990a; Israeli *et al.* 1991). In the banana industry, dwarf off-types are therefore regarded as inferior, with poor commercial prospects.

It has not been possible to detect dwarf off-types during micropropagation and nursery establishment; often growers are unaware of a problem until 3–4 months after field establishment. Recently, Israeli *et al.* (1991) and C. Teisson (pers. comm.) demonstrated that dwarfs can be selected before release of plants from the nursery, based on differences in height, distance between petioles, and leaf size. This paper quantifies these differences and provides additional selection criteria for the early detection of dwarf off-types in the glasshouse and prior to the supply of plants to the grower.

Materials and methods

Experimental procedures and design

For the comparative study between the dwarf and normal plants, a dwarf off-type was selected that was recovered from a micropropagated line of Cavendish (*Musa* sp., AAA Group) cv. New Guinea Cavendish and fully characterised in the field (Smith and Drew 1990a). The following Cavendish cultivars (shortest to tallest; Turner and Hunt 1984) were used in a comparison of growth parameters: Dwarf Parfitt, Dwarf Cavendish, Grande Naine, New Guinea Cavendish, Williams.

All plants were first established in culture by the procedure of Smith and Drew (1990b). Plants were multiplied on a Murashige and Skoog (1962) basal medium supplemented with 2.5 mg/L of benzylaminopurine, 2% sucrose, and 0.8% Difco-Bacto agar. They were subcultured every 6–8 weeks. Plants were subcultured to a hormone-free medium for root development before acclimation in the glasshouse.

Plantlets were deflasked in a sheltered area near the glasshouse. Roots were gently washed free of nutrient agar and planted in seedling trays (28 by 35 cm) containing steam-pasteurised potting mix. The sand-peat (2:1) mixture contained the following nutrients (g/m³) with 3.6 kg/m³ of dolomite: ammonium sulfate (544), superphosphate (184), potassium sulfate (248), magnesium sulfate (472), copper sulfate (7.2), zinc sulfate (9.6), iron sulfate (7.2). The plants were watered and enclosed in a plastic tent to maintain a high humidity. After 1 week, the plastic was gradually opened and by the end of the second week the plants were transferred to 5-cm-diameter tubes. The plants were transferred again after 2 weeks to 14-cm-diameter pots. They were watered as required, and Aquasol was applied fortnightly at the recommended rate.

The study took place over 7 weeks (26 February–9 April 1990). At the end of this period, plants were established in the field and grown to bunch emergence, to verify trueness to type and to eliminate the possibility that off-types may have arisen during micropropagation. Plants were grown in a glasshouse with fan-forced heaters and evaporative coolers, with daily temperature range 20–32°C.

For the comparison of dwarf and normal plants, the experimental design was a randomised block with 6 blocks corresponding to rows and 8 plants in each row. The 8 plants consisted of 2 treatments replicated 4 times

and randomly allocated to the 8 positions within each row. The treatments were dwarfs and normal plants. To minimise edge effects, guard plants were placed in a perimeter row around the entire block. The comparative trial of Cavendish cultivars was analysed as a completely randomised design with 5 cultivars and 10 replications of single-plant plots.

Measurements

Measurements commenced when the plants were transferred to 5-cm tubes. The oldest fully expanded leaf was about 28 mm long and 17 mm wide and was labelled with a permanent ink marker as leaf 1. This approximated the first leaf formed after deflasking and served as a reference point for future weekly measurements. Leaf data were obtained from fully expanded leaves only. Measurements included height from soil level to the base of the youngest petiole; petiole length from the point where the petiole adjoins the pseudostem to the base of the lamina; lamina length; lamina width one-third of the way along the length of the lamina; and distance between leaves, measured from the midpoint of one leaf to the next. The distance between leaves was best observed from the side and was considered a good indicator of the degree of stunting in plants.

Statistical analysis

All data were analysed by analysis of variance. Where appropriate, pairwise testing between treatments was done using l.s.d. at $P = 0.05$ and 0.01 .

Results

At the time of deflasking and during the initial stages of acclimation in plastic tents, there were no obvious differences between the dwarf off-type and normal plants of New Guinea Cavendish. Significant differences occurred after repotting plants into 5-cm tubes. Petiole

Table 1. Leaf characteristics of micropropagated dwarf off-types (D) and normal (N) New Guinea Cavendish bananas grown under glasshouse conditions

Values are means of 24 replicates. Plants were transplanted into larger containers at week 1 and weeks 3–4

Week	Leaf no.	Petiole length (mm)			Lamina length (mm)			Lamina width (mm)			Lamina: petiole length			Leaf index (length:width)		
		N	D	l.s.d.	N	D	l.s.d.	N	D	l.s.d.	N	D	l.s.d.	N	D	l.s.d.
1	1	5.2	3.4	1.70*	41.6	36.3	n.s.	17.5	16.0	n.s.	10.89	12.42	n.s.	2.38	2.31	n.s.
1	2	9.3	5.6	1.60**	62.6	55.4	n.s.	24.8	23.0	n.s.	6.91	11.45	3.01**	2.54	2.41	n.s.
2	3	8.5	5.7	1.54**	86.3	75.4	9.72*	36.4	32.6	n.s.	10.91	14.32	2.91**	2.39	2.34	n.s.
2	4	11.0	7.1	1.02**	114.8	96.8	9.43**	50.5	45.1	n.s.	11.15	14.55	2.38*	2.29	2.15	0.117*
3	5	15.1	9.0	1.84**	133.3	115.6	9.41**	65.4	57.5	6.25*	9.82	13.39	3.08**	2.04	2.03	n.s.
4	6	22.1	14.3	2.10**	163.6	137.9	10.77**	81.7	75.3	4.41*	7.55	10.04	1.21**	2.01	1.83	0.056**
5	7	21.9	16.7	1.87**	198.0	166.5	11.54**	101.2	90.6	6.54**	9.12	10.09	0.86**	1.96	1.84	0.066**
6	8	24.8	18.3	2.86**	227.5	192.1	13.04**	115.6	107.1	6.53*	9.31	10.80	1.41**	1.97	1.79	0.088**
7	9	28.2	19.0	1.88**	266.9	227.5	14.67**	133.5	122.5	5.86**	9.53	12.30	1.44**	2.00	1.86	0.052**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; n.s., not significant.

Table 2. Distance (mm) between leaves of micropropagated dwarf off-type and normal New Guinea Cavendish bananas grown under glasshouse conditions

Plants were transplanted into larger containers at week 3-4
Values are means of 24 replicates

Week	Leaf no.	Normal	Dwarf	L.s.d.
2	1-2	16.9	12.5	2.95*
2	2-3	16.8	14.0	2.72*
2	3-4	20.5	16.9	3.39*
3	4-5	22.5	13.5	2.64*
4	5-6	17.5	16.5	n.s.
5	6-7	22.2	21.6	n.s.
6	7-8	33.4	25.5	5.23*
7	8-9	42.2	25.6	7.70**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; n.s., not significant.

and lamina lengths provided the most promising measurements for discriminating between normal and dwarf plants (Table 1). Newer leaves were larger than older ones and the differences between normal plants and dwarf off-types became increasingly obvious. By week 7, the mean petiole and lamina lengths of the normal plants were 28.2 and 266.9 mm, respectively, while for the dwarf plants they were 19.0 and 227.5 mm ($P < 0.01$). The ratio of lamina to petiole length was also significantly different between dwarf and normal plants for most of the study (Table 1). Lamina width (Table 1) and distance between leaves (Table 2), while not as useful for discriminating between normal and dwarf plants during the earlier stages of growth, became more useful toward the end of the trial. The height difference between dwarf and normal plants was also more significant ($P < 0.01$) at week 7 (normal plants 18.7 cm v. dwarfs 13.6 cm; Fig. 1).

When growth became limiting in tubes, height differences between dwarfs and normal plants diminished. Discrimination was most effective after the plants were growing vigorously in 14-cm pots (Fig. 1).

Despite significant differences existing for a number of characteristics, there was still some overlap between dwarf and normal plants with regard to distributions about the mean (Table 3). This placed some limitations on the successful detection of dwarf off-types. Plants were grown to bunch emergence in the field, and this confirmed that the normal plants contained no dwarf off-types and vice versa.

The comparison of Cavendish cultivars of various statures showed trends similar to the previous trial (Fig. 2, Table 4). The mean height of the extra-dwarf, Dwarf Parfitt, was significantly ($P < 0.01$) less than the other cultivars from week 2 onwards. This was most

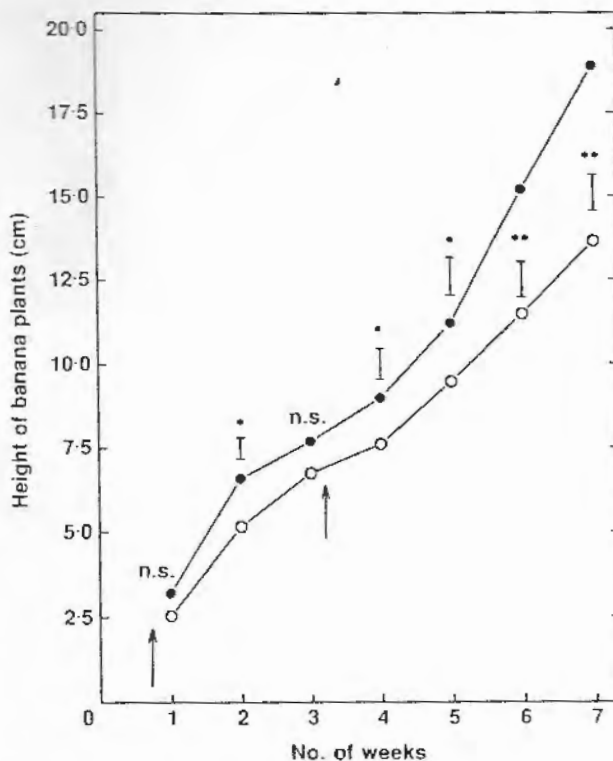


Fig. 1. Mean height of micropropagated dwarf off-type (○) and normal (●) New Guinea Cavendish bananas grown under glasshouse conditions. Values are means of 24 replicates. Arrows indicate the stages when the plants were transplanted into larger containers. Vertical bars indicate L.S.D. at $P = 0.05$ (*) and 0.01 (**).

Table 3. Mean and range for characteristics of micropropagated dwarf off-type and normal New Guinea Cavendish bananas grown under glasshouse conditions

Values are the means of 24 replicates
Data were collected from 7-week-old plants, when differences were greatest

	Normal		Dwarf off-type	
	Mean	Range	Mean	Range
Height (cm)	151.5	138-223	114.8	89-165
Petiole length (mm) ^A	28.2	18.6-36.1	19.0	12.1-27.0
Lamina length (mm) ^A	266.9	228-304	227.5	187-261
Lamina width (mm)	133.5	121-154	122.5	97-138
Leaf index (length: width)	2.00	1.83-2.17	1.86	1.70-2.00
Lamina: petiole length	9.5	8.2-12.8	12.3	8.5-18.5
Distance between leaves 8 and 9 (mm)	42.2	20.5-75.8	25.6	9.5-39.7

^A Measured on leaf 9.

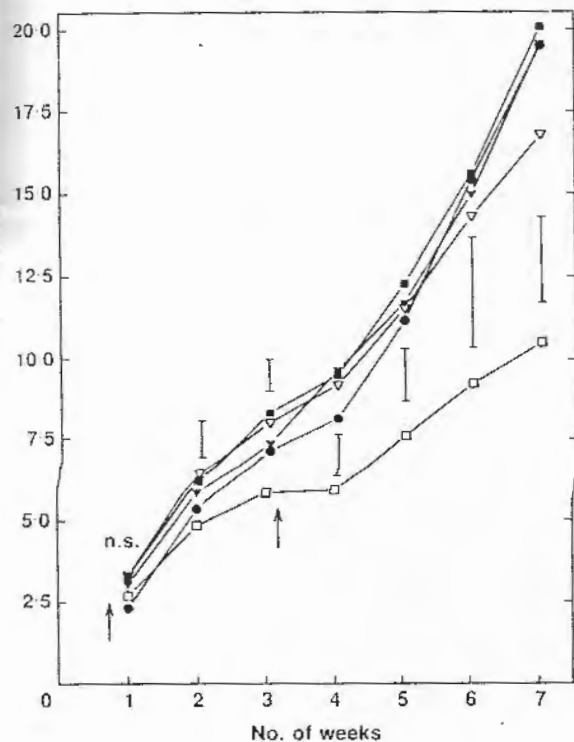


Fig. 2. Mean height of micropropagated Cavendish (AAA) bananas grown under glasshouse conditions. Dwarf Parfitt (□), Dwarf Cavendish (▽), Grande Naine (■), New Guinea Cavendish (●) and Williams (▼). Arrows indicate the stages at which plants were transferred into larger containers. Vertical bars indicate 1 s.d. at $P=0.05$.

obvious at week 7, when the plants were ready for field establishment. Height (Fig. 2), petiole length, lamina length, lamina width, and distance between leaves (Table 4) were significantly ($P<0.01$) smaller in Dwarf Parfitt than in all other Cavendish cultivars. Dwarf Cavendish formed an intermediate class, significantly



Fig. 3. Characteristics of (a) micropropagated dwarf off-type and (b) normal New Guinea Cavendish bananas grown under glasshouse conditions. Note shorter petioles and shorter, rounder leaves of the dwarf off-type.

($P<0.01$) greater than Dwarf Parfitt, but significantly ($P<0.05$) smaller than the other Cavendish varieties, particularly with regard to height and petiole length. There were no significant differences for any growth parameter between Grande Naine, New Guinea Cavendish, and Williams.

Table 4. Characteristics of micropropagated Cavendish (AAA) bananas grown under glasshouse conditions

Values are the means of 10 replicates
Data were collected from 7-week-old plants when differences were greatest

	Dwarf Parfitt	Dwarf Cavendish	Grande Naine	New Guinea Cavendish	Williams	1 s.d.	
						($P=0.05$)	($P=0.01$)
Height (cm)	10.5	16.7	20.0	19.5	19.6	2.58	3.44
Petiole length (mm) ^A	11.4	22.7	29.4	33.2	30.7	5.68	7.57
Lamina length (mm) ^A	155.9	242.2	245.1	252.7	255.4	21.41	28.54
Lamina width (mm) ^A	92.8	129.2	126.4	122.1	131.3	10.71	14.27
Leaf index (length: width)	1.68	1.87	1.94	2.07	1.94	0.087	0.115
Lamina: petiole length	15.3	10.8	8.5	7.8	9.4	2.47	3.30
Distance between leaves 8 and 9 (mm)	19.1	31.2	39.3	45.7	44.1	10.51	14.00

^A Measured on leaf 9.

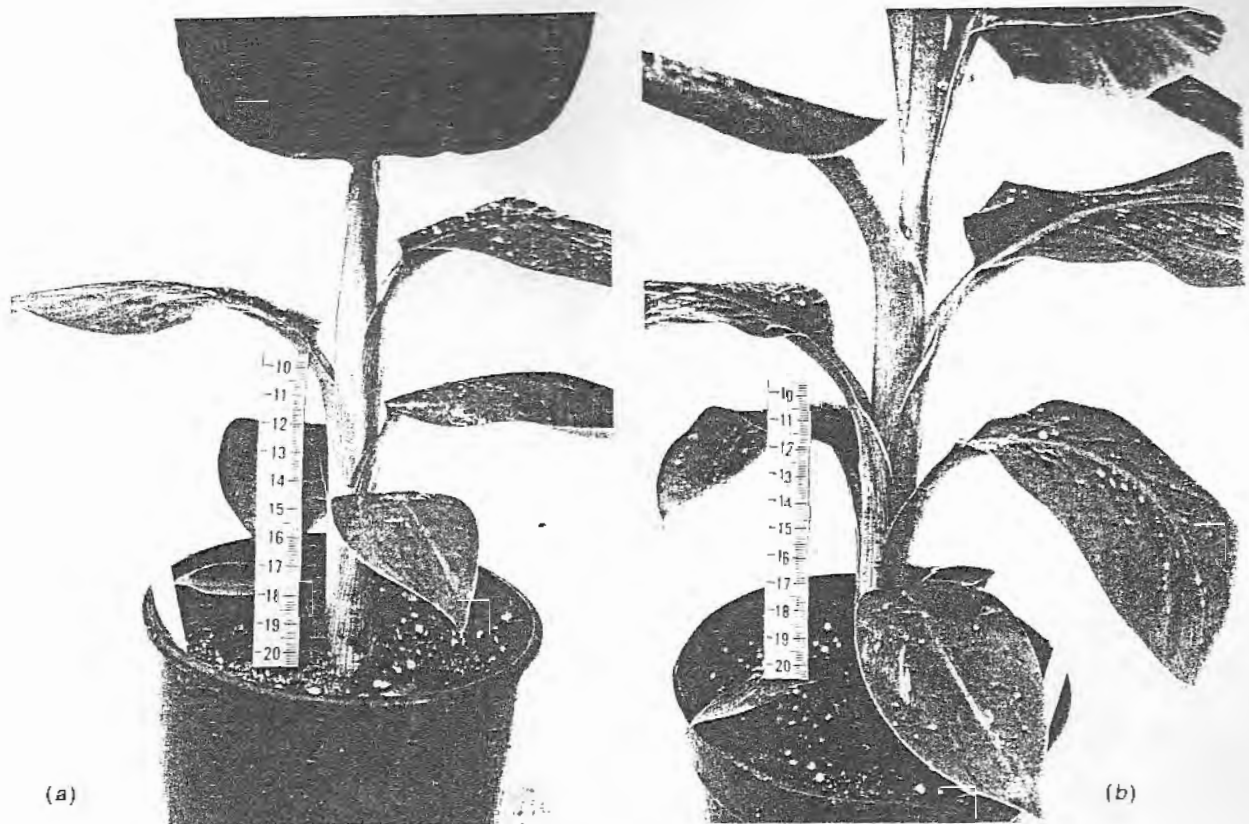


Fig. 4. Characteristics of (a) micropropagated dwarf off-type and (b) normal New Guinea Cavendish bananas grown under glasshouse conditions. Note the shorter petioles, smaller distance between leaves, and reduced height of the dwarf off-type. Scale units: cm.

Discussion

Dwarf off-types could be readily distinguished from normal micropropagated bananas in the glasshouse. Petiole length, lamina length, and the ratio between petiole and lamina lengths provided the earliest and most reliable measurements for discrimination, but differences were greatest at week 7 when the normal plants were 18–20 cm tall and ready for field establishment (Table 1). Other parameters such as height (Fig. 1), lamina width, length to width ratio (Table 1), and distance between leaves (Table 2) were also useful for discriminating between dwarf and normal plants, but only towards the end of the trial. When the plants were viewed from above (Fig. 3), dwarfs could be easily distinguished by their shorter petioles and shorter, rounder leaves. From the side (Fig. 4), again the shorter petioles of the dwarfs were readily apparent, but height and distance between leaves were also important indicators. This is in close agreement with the observations of Israeli *et al.* (1991), but they suggested that the earliest stage at which dwarfs could be detected was the end of their growth in the nursery, when the plants were 35–40 cm tall.

Detection of dwarf off-types was more assured when the plants were growing vigorously. When growth became limiting in the 5-cm tubes, selection became more difficult. It is therefore important that plants are grown under conditions that stimulate growth, and that conditions in the nursery are as uniform as possible. In an earlier experiment (M. K. Smith and S. D. Hamill unpublished data), dwarf and normal plants were grown as described above; however, the plants were grown for too long in 5-cm tubes and were not repotted into 14-cm pots until week 5. Although petiole lengths in dwarf and normal plants were significantly ($P < 0.05$) different during weeks 3 and 4 (data not presented), discrimination was then very difficult until week 8. It was necessary to hold the plants longer in the nursery to ensure adequate screening for dwarf off-types.

Distinguishing dwarf and normal plants was easiest at the extremes of the population distributions (Table 3). Where the distributions for any characteristic overlapped, discrimination depended on examining the range of characteristics and making a judgment. We have used these selection criteria with commercially

micropropagated Cavendish cultivars (i.e. Williams, Grande Naine), and when screening occurred under the glasshouse conditions described, the proportion of dwarfs reaching the grower was restricted to <5%. When these selection criteria were used on plants grown in another nursery where growth was not uniform and conditions were suboptimal, dwarf establishment in the field was as high as 25%. This occurred despite recovering >92% dwarf off-types in the selected population. In nurseries in south-eastern Queensland, plants are usually deflasked in June–July for a planting in September–October. In these non-heated enclosures it therefore takes about 3 months for plants to grow to 20 cm, which is twice as long as in a temperature-controlled environment. In North Queensland, the plants would not be subjected to such temperature fluctuations. The need to provide uniform, vigorous growing conditions is emphasised.

Following the demonstration by Reuveni (1990) of dwarf plantlets' insensitivity to internode elongation with gibberellic acid (GA_3), C. Teisson (pers. comm.) showed that an application of 100 mg GA_3/L to micropropagated bananas assists in discriminating dwarfs from normal plants in the nursery. Gibberellic acid application enhances differences between dwarf and normal plants, particularly with respect to height and petiole length. We are currently evaluating the screening potential of GA_3 at lower concentrations and determining whether there are any undesirable long-term effects on bananas. Commercial nurserymen have noticed that the leaves of dwarf bananas have a deeper green colour, and this characteristic warrants investigation.

The results from the study using cultivars of various statures support the view that the selection criteria developed here will be useful for screening dwarf and extra-dwarf off-types from the 2 major Cavendish cultivars grown throughout the world, Grande Naine and Williams. The taller Cavendish cultivars (Grande Naine, New Guinea Cavendish, Williams) were indistinguishable at any stage from deflasking to the conclusion of their growth in the glasshouse. However, Dwarf Cavendish and the extra-dwarf cultivar, Dwarf Parfitt, were easily distinguished by week 7 (Fig. 2, Table 4). Dwarf Cavendish is an accepted commercial variety with better growth and performance than the dwarf off-type used in this experiment. This was reflected in the measurements, as the dwarf off-type was shorter and produced smaller petioles and leaves than the commercial dwarf variety.

Conclusion

Because selection for dwarf off-types is based on comparison with normal plants, nurserymen should be familiar with the general growth characteristics of micropropagated bananas. Plants deviating from the normal, especially if they show the dwarf characteristics outlined above, should be removed before plants are supplied to the grower. Although growth regimes and

facilities will vary, it is important that selection is based on plants growing under uniform, vigorous conditions. Commercial nurseries dealing with tens of thousands of plants are unlikely to do physical measurements; rather, dwarf off-types will be detected by eye. However, we believe that most dwarf plants can be culled visually, and that discrimination will be best at the later stages of growth in the nursery. This may require the plants be grown to >20 cm. Extra plants may also be supplied to the grower so that replacements can be made up to 1 month after transplanting in the field, when off-types are even more obvious. Ideally, earlier methods of detection are needed, preferably at the *in vitro* level. A greater understanding of somaclonal variation is required, so that it can be controlled during banana micropropagation.

Acknowledgments

We thank J. W. Daniells and P. Slocombe for critically reviewing the manuscript. We also thank V. Doogan for the statistical analysis of data. The financial support of the Queensland Banana Industry Protection Board, the Horticultural Research and Development Corporation, and the Australian Centre for International Agricultural Research is gratefully acknowledged.

References

- Daniells, J., and Smith, M. K. (1991). Post-flask management of tissue-cultured bananas. ACIAR Technical Report No. 18.
- Drew, R. A., and Smith, M. K. (1990). Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30, 569–74.
- Israeli, Y., Reuveni, O., and Lahav, E. (1991). Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. *Scientia Horticulturae* 48, 71–88.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–97.
- Reuveni, O. (1990). Methods for detecting somaclonal variants in 'Williams' bananas. In 'Identification of Genetic Diversity in the Genus *Musa*.' Proceedings of an International Workshop held at Los Banos, Philippines, 5–10 September 1988. (Ed. R. L. Jarret.) pp. 108–13. (IBPGR Publications: Rome.)
- Smith, M. K., and Drew, R. A. (1990a). Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue-cultured bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30, 575–8.
- Smith, M. K., and Drew, R. A. (1990b). Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Australian Journal of Plant Physiology* 17, 267–89.
- Turner, D. W., and Hunt, N. (1984). Growth, yield and leaf nutrient composition of 30 banana varieties in subtropical New South Wales. Department of Agriculture New South Wales Technical Bulletin No. 31.

Received 16 July 1992, accepted 18 January 1993