

RESUMEN

La salinidad y sequía son algunas de las causas más importantes de la pérdida de tierras agrícolas y de la productividad en muchas partes del mundo, siendo la utilización de variedades resistentes de los cultivos la solución económicamente viable a este problema. En este trabajo se utiliza el cultivo de callo *in vitro* para estudiar las respuestas celulares a éstos factores de estrés; separadas de la respuesta de la planta completa. Para esto, se indujo la formación de callo *in vitro* de frijol de cuatro variedades: pinto americano, pastilla, flor de mayo y flor de junio a partir de diferentes explantes (hipocotilo, hoja cotiledonaria y cotiledón) de plántulas de frijol obtenidas asépticamente, en dos concentraciones de 2,4-D (5 y 10 mg/L) en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), a un fotoperíodo de 16 horas y a una temperatura de 26 ± 2 °C. Se seleccionó el explante de hoja cotiledonaria en la concentración de 5 mg/L de 2,4-D, ya que bajo estas condiciones se obtiene la mayor cantidad de callo *in vitro*. Se realizaron subcultivos de los callos *in vitro* bajo las condiciones de estrés. Para el factor salinidad se utilizaron dos concentraciones de cloruro de sodio (0.1 y 0.15 M) y para sequía dos concentraciones de polietilenglicol (10 Y 15 %). A los callos tratados y a sus respectivos testigos se les realizó un perfil de minerales por digestión vía seca. De acuerdo con el análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias (Zar,1996) se encuentran diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades para Ca, Mn, Mo, Na, Fe y Cu asimismo entre los tratamientos para Na, Mg, Ca, Mn y Zn para el factor de estrés salinidad; en cuanto a sequía; hemos observado que entre las variedades

se encuentran diferencias significativas ($P < 0.01$) en Na, K, Mo, Fe, Zn, Mg, Mn y Cu; y entre tratamientos para Na, Mg, K, Mn, Fe, Cu, Zn y Mo. En la cuantificación espectrofotométrica de prolina se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variedades y tratamientos para salinidad y sequía. En el perfil de proteínas con la técnica de gel de poliacrilamida-sds, se encontró la presencia de polipéptidos de 25, 28 y 33 kDa en las variedades pinto americano, pastilla y flor de mayo en el estrés de salinidad y en las variedades pastilla y flor de junio un polipéptido de 30 kDa en el estrés de sequía. En los estudios de ultraestructura por microscopio electrónico de transmisión, se observa sólo pared celular y escaso citoplasma en las cuatro variedades en todos los tratamientos.

ABSTRACT

Salinity and drought are some of the most important reasons for the lost of cultivable land and crop yield in many areas of the world, being the utilization of resistant varieties the economical solution for this problem. In this work the *in vitro* callus culture to study the cell responses to these stress factors apart from the whole plant. For this, the formation of callus from four varieties of bean (pinto americano, pastilla, flor de mayo and flor de junio) was induced *in vitro* from different aseptically obtained seedling explants (hypocotyl, cotyledonary leaf and cotyledon) under two concentrations of 2,4-D (5 and 10 mg/L) in culture medium of Murashige and Skoog (1962) with a 16 h light photoperiod and a temperature of 26 ± 2 °C. An explant from cotyledonary leaf was selected under the 5 mg/L concentration of 2,4-D because under these conditions the highest quantity of callus *in vitro* was obtained. Subcultures of the *in vitro* callus were obtained under the stress conditions. For the salinity stress two concentrations of sodium chloride (0.1 and 0.15 M) were utilized while for the drought stress two concentration of polyethylene glycol (10 and 15%) were applied. A mineral profile was realized to the treated calli and their respective controls trough dry digestion (AOAC, 1991 by EEP-ICP). According to the analysis of variance and the multiple mean comparisson technique (Zar, 1996) highly significant differences ($p < 0.01$) were found among varieties for Ca, Mn, Mo, Na, Fe and Cu and among treatments for Na, Mg, Ca, Mn and Zn for the salinity stress factor. For the drought stress, we observed high significant differences among varieties ($p < 0.01$) for Na, K, Mo, Fe, Mg, Mn and Cu and among treatments for Na, Mg,

K, Mn, Fe, Cu, Zn and Mo. In the spectrophotometric quantification significant differences ($p < 0.05$) were observed among varieties and treatments for salinity and drought. In the polyacrilamide gel protein profile the presence of three polypeptides of 25, 28 and 33 kDa were observed in the varieties pinto americano, pastilla and flor de mayo in the salinity stress and in the varieties pastilla and flor de junio a 30 kDa polypeptide was observed in the drought stress. The ultrastructural study under the transmission electron microscope only cell walls and scarce cytoplasm were observed in all treatments of the four varieties.

I. INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se encuentra entre los cultivos más importantes por su producción y aprovechamiento para el consumo humano y animal así como en la industria (Aguilera y Robles, 1975, INEGI, 1991, FAO, 1992, Foster, 1993, Maiti *et al.*, 1996, Maiti, 1997).

El establecimiento de las plántulas es uno de los principales problemas en las regiones semiáridas a causa de una serie de factores relacionados con la semilla y su ambiente. Observaciones en campo en el Noreste de México mostraron que la sequía, salinidad y altas temperaturas son los principales problemas que afectan el establecimiento inicial, de frijol y otros cultivos; por lo que es necesario el desarrollo de técnicas para la selección de genotipos resistentes a estos factores de estrés (Maiti, 1996).

Técnicas como el cultivo de tejidos se han convertido en una invaluable ayuda en el campo de la botánica experimental, pues permite el estudio de problemas básicos relacionados con el crecimiento y diferenciación bajo condiciones altamente reproducibles, en particular, la técnica de cultivo de callo *in vitro* nos brinda la oportunidad de estudiar las respuestas celulares, separadas de la respuesta de la planta completa. Debido a lo anterior se pretende utilizar esta herramienta para evaluar las respuestas de frijol a los factores de estrés salinidad y sequía.

II. ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

Existe suficiente información sobre mecanismos de resistencia de frijol a salinidad y sequía a nivel de plántula, pero hay pocos estudios sobre determinación de nutrimentos, prolina libre, perfil de proteína, anatomía y ultraestructura a nivel de callo *in vitro*, esta investigación pretende establecer las bases para evaluar las respuestas que permitan en un futuro determinar los mecanismos para la resistencia a éstos factores.

III. HIPOTESIS

Las variedades de frijol difieren en respuestas bioquímicas y ultraestructurales a nivel de callo *in vitro* relacionadas con sus mecanismos de adaptación a condiciones de estrés de salinidad y sequía.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios bioquímicos y ultraestructurales de frijol a nivel de callo *in vitro* y su posible relación con los mecanismos de resistencia a estrés de salinidad y sequía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selección del explante y establecimiento aséptico del cultivo *in vitro*.
- Determinar la concentración de 2,4-D para la inducción de callo *in vitro* de las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Observar la respuesta de los callos de frijol obtenidos *in vitro* a los factores de estrés de salinidad y sequía.
- Evaluar los efectos de los factores de salinidad y sequía en callos de frijol, sobre nutrimentos, prolina libre, perfil de proteína y ultraestructura a nivel de callo *in vitro*.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

SALINIDAD

En las regiones donde la precipitación pluvial es baja y las temperaturas son elevadas, existe la tendencia a la acumulación de sales solubles cerca de la superficie del suelo; en la época de lluvias las sales son arrastradas a estratos inferiores del suelo, pero el alto índice de evaporación de la época de sequía las retorna a las capas superiores (Sandoval, 1991). La salinidad es una de las causas más importantes en la pérdida de tierras agrícolas y de la productividad en muchas partes del mundo, siendo la utilización de variedades resistentes de los cultivos la solución económicamente viable a este problema (Flowers *et al.*, 1977, Yeo y Flowers, 1980).

EFFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE ALGUNAS FUNCIONES

FISIOLÓGICAS: Dentro de los eventos que se relacionan con la semilla se encuentran los que modifican su viabilidad, la mayoría de los trabajos mencionan una reducción en la capacidad de germinación de la semilla sometida a estrés salino (Pan, 1984, Malibari *et al.*, 1993). Se han realizado estudios sobre el efecto del NaCl (-1 MPa de presión osmótica) bajo condiciones óptimas de humedad, encontrando que es más significativo el efecto sobre crecimiento de la plántula (reducción de la acumulación de materia seca, la altura de la planta y en el desarrollo de la raíz) que sobre la tasa de germinación bajo esas condiciones (Cramer *et al.*, 1988, Venter y Van de Venter, 1988). Otros trabajos sobre el efecto de la salinidad en el crecimiento utilizando soluciones nutritivas para un mejor

control de las concentraciones salinas, han demostrado, que incrementos en la salinidad reducen la altura y longitud de la raíz, el peso específico de la hoja, el área foliar y la producción de materia seca (Mishra *et al.* , 1994). Revilla y Cañal (1999) utilizan el cultivo de tejidos como una herramienta para estudiar los efectos fisiológicos de las sales a nivel celular, evitando la complejidad fisiológica y estructural de la planta.

En un estudio, en raíz y cultivo de callo de hipocotilo de *Phaseolus vulgaris* crecido en MS el suplementado con NaCl 2 M, observaron que la salinidad del medio en oscuridad suprimió el crecimiento del tejido y reforzó la actividad de la IAA-oxidase. En subcultivos posteriores en medio de NaCl; K⁺, Na⁺ y Ca⁺⁺ aumentaron en el tejido (Komizerko *et al.*, 1988) citado por Maiti, *et al.*, (2000). Al estudiar la regulación de la homeostasis de Na⁺ y K⁺ en plantas y hongos Quintero, *et al.*, (1999) realizaron un análisis genético molecular y mencionan que tanto las células vegetales como las de hongos responden a la imposición de un estrés salino (NaCl) restringiendo la entrada de Na⁺, mejorando la captación de K⁺ y aumentando la capacidad de acumulación de Na⁺ en la vacuola.

Broetto *et al.*, (1995) y Sawires *et al.* , (1997) citados por Maiti, *et.al.*, (2000) informaron respectivamente que en tensión-NaCl el tratamiento redujo el crecimiento relativo y el volumen de proteína, sin embargo el volumen de prolina fue aumentado y que hubo cambios bioquímicos asociados con la tensión de sal en guisante y cultivo de tejido de frijol. En cuanto a callo cultivado en medio de MS con NaCl 0 a 1.2%, indicó que ese crecimiento del

callo fue estimulado por NaCl 0.3% pero fue disminuido por niveles de salinidad más altos. También se observó que las concentraciones de sodio, los hidratos de carbono y prolina libre aumentaron con la salinidad creciente, mientras las concentraciones de K⁺ de callo disminuyeron con el nivel de NaCl. El volumen de la proteína disminuyó en callo de *P. vulgaris*.

Estudios realizados en callos de guisante y frijol muestran que el crecimiento del callo fue estimulado por NaCl 0.3% pero fue disminuido por niveles de salinidad más altos. Las concentraciones de sodio, hidratos de carbono y prolina libre generalmente aumentaron con salinidad creciente y disminuyó la concentración de K en el callo. (Sawires *et al.*, 1997) citado por Maiti, *et al.*, (2000).

EFFECTO DE ESTRÉS DE SALINIDAD SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

Existen diversas investigaciones acerca de la presencia de proteínas que intervienen en la tolerancia a la salinidad en diferentes cultivos agrícolas donde se demuestran que la salinidad promueve la síntesis de proteínas específicas de estrés de salinidad (SSSP, salt stress specific-protein) provocando un aumento (Levitt, 1972) o una disminución (Dubey, 1994) en el contenido de proteína total según la especie (Hurkman y Tanaka, 1987, Singh *et al.*, 1985, Ramagopal, 1986, Singh *et al.*, 1987, Ben-Hayyim *et al.*, 1989) estos estudios son realizados en cultivo de tejidos por la facilidad de controlar las variables, además de poder preservar una línea de células resistentes a la salinidad. Singh *et al.*, (1985)

reportaron que en cultivo de células de tabaco, el proceso de adaptación celular al estrés osmótico (estrés salino) involucra una alteración específica en la expresión génica de las células adaptadas que induce a síntesis de proteínas *de novo*, incluyendo la predominancia de una proteína de 26 kDa, llamada osmotina. Esta se considera como proteína única asociada a células de tabaco adaptadas a la salinidad (Singh *et al.*, 1987). Es interesante decir que la síntesis de la osmotina no es inducida por el choque osmótico porque comienza solo cuando las células son adaptadas a NaCl o PEG (Singh *et al.*, 1985). Se estima que el papel de la osmotina es inducir en la célula el ajuste osmótico al facilitar la acumulación de solutos o al permitir alguna alteración metabólica en la célula. Ericson y Alfinito (1987) encontraron la presencia de 2 polipéptidos (20 y 32 kDa) en forma mas abundante en células de tabaco adaptadas a la salinidad que en células no adaptadas. En variedades resistentes de maíz se encontró un polipéptido con peso molecular de 26 kDa (Ramagopal, 1986).

En arroz se encontró que los patrones de proteínas de las líneas susceptibles y tolerantes, mostraron diferencias creciendo en presencia y ausencia de NaCl. Las líneas tolerantes poseían una proteína de 28 kDa en el vástago y ausente en las líneas susceptibles, la presencia de esta proteína se relacionó con la tolerancia del arroz a la salinidad (Rani, 1988).

Estudios realizados en callos de guisante y frijol observaron que el volumen de la proteína generalmente aumentó debida a salinidad en callo del guisante, pero disminuyó en *P. vulgaris* (Sawires *et al.*, 1997) citado por Maiti *et al.*, (2000).

Yang *et al.*, (1990) citado por Mir Araujo (1996) reporta que callo de sorgo crecido en MS líquido con 0.05, 0.1 y 1.5 M de NaCl, después de dos semanas el tratamiento de NaCl dio una coloración café a los callos; la relación Na^+ / K^+ fue más baja en callos de *S. halapense* que en *S. bicolor*, y el contenido de prolina aumentó. Por lo que la proporción Na^+ / K^+ en callos salinizados, puede ser utilizada como indicador de la tolerancia a la salinidad de la planta completa de *Sorghum*.

Proteínas inducidas por calor (hsp)

Se ha comprobado la síntesis de proteínas inducidas por choque térmico (hsp) en respuesta a otros factores de estrés, como: déficit hídrico, ácido abscísico, salinidad dinitrofenol, arseniato y altas concentraciones de auxinas y etileno. Estas proteínas hsp, también conocidas como ubiquitinas, marcan a las proteínas para su degradación y el mecanismo de proteólisis depende de esta marca. El gen que codifica para la ubiquitina, requiere para su activación los mismos elementos regulatorios de las hsp (Schlesinger, 1990). Específicamente, en plántulas de maíz ha sido posible relacionar la presencia de una proteína hsp de 45 kDa con la tolerancia al estrés, ya que se expresa solo en la variedad resistente al calor y la sequía, y no en la variedad susceptible, bajo las mismas condiciones de evaluación (Ristic *et al.*, 1991).

ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Olmos y Hellín, (1996) al observar a nivel ultraestructura las características de las células susceptibles a salinidad, encontraron que éstas poseían grandes

vacuolas. La vacuola central estaba rodeada por una delgada capa de citoplasma, conteniendo abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y plastos. Se encontraron cuerpos lipoides distribuidos en el citoplasma.

Mir Araujo, (1996) en observaciones de ultraestructura a callos *in vitro* de sorgo bajo estrés de salinidad, reporta células con altos niveles de almidón y lípidos, cloroplastos y mitocondrias abundantes y un sistema de membranas bien desarrollado, acumulación de lípidos en la periferia de la célula, comparadas con los testigos que presentan menor número de organelos y menor contenido de grasas y almidones. En células con estrés a sequía el número de organelos se reduce, aumenta el número de vacuolas y se observa una gran cantidad de vesículas o invaginaciones de la membrana y citoplasma con acumulación o concentración de materiales.

SEQUIA

La sequía es un fenómeno que limita en gran medida el cultivo y producción de las plantas. Se conocen múltiples adaptaciones fisiológicas que pueden contribuir a mejorar la tolerancia al déficit hídrico. Quizás, la adaptación que más claramente se ha asociado con la tolerancia a la sequía es el mantenimiento al turgor por ajuste osmótico. Sin embargo, su aplicación a programas de mejora es complicada debido a la falta de criterios sencillos y rápidos para identificar genotipos mantenedores del turgor, (Sánchez, *et al.*, 1999).

En los trópicos semiáridos, muchos son los cultivos que padecen largos periodos de sequía afectando su establecimiento y provocando alteraciones bioquímicas (Dubey, 1994). Por lo anterior es necesario seleccionar material tolerante a

condiciones de sequía que nos permita mejorar la producción bajo esta condición. La evaluación y selección a nivel de campo se dificulta por la variabilidad en las condiciones edafoclimáticas, sin embargo, estas pueden realizarse en condiciones controladas (Maiti, *et al.*, 1989), lo que permite un mejor manejo de las líneas, siendo este tipo de selección aceptable.

EFFECTOS DE LA SEQUÍA SOBRE ALGUNAS FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Se ha demostrado que existen diferencias en los requerimientos de humedad del suelo para la germinación de semillas de distintas especies (Adebona y Ayisire, 1979). La sequía es un factor que inhibe marcadamente la germinación, pero para que se presenten diferencias aparentes entre los híbridos de maíz es necesario aplicar un grado de sequía más severa. Dentro de las respuestas que manifiesta el maíz está la acumulación de prolina en las hojas, factor que se puede usar como indicador de resistencia a la sequía (Grzesiak, 1991). Un método para seleccionar genotipos, híbridos o líneas resistentes a la sequía es la capacidad de germinación en un medio hiperosmótico, las líneas seleccionadas mediante este método manifiestan ventaja sobre la población original en condiciones tanto de humedad como desfavorables en etapa de plántula (Castellanos, 1992). López-Nuño (1994), demostró que el incremento en la presión osmótica causada por soluciones de manitol, entre otras variables, provocan una disminución en el porcentaje de germinación.

Las características relacionadas con las adaptaciones de frijol en condiciones de semiaridez en Kenya fueron estudiados por Itulya, *et al.*, (1986) seleccionando varios cultivares adaptados a tales condiciones. Se ha encontrado que el color de

la semilla, su tamaño, brillantez, hábito de crecimiento, días de floración, madurez, adaptación vegetativa y reproductiva, nodulación, daños por factores bióticos, resistencia a la sequía y tolerancia a los factores del suelo son considerados para la evaluación de los cultivares de frijol para su adaptación a tales condiciones (CIAT, 1987).

Los mecanismos de adaptación a la sequía fueron estudiados en CIAT (1988), evaluando longitud de hipocotilo, persistencia de raíz principal, fibrosis general y abundancia de raíz secundaria en 100 genotipos de frijol. El crecimiento de la raíz es mayor en todas las etapas en las líneas resistentes a la sequía comparado con las líneas susceptibles, observando que el cruzamiento entre especies mexicanas y colombianas produce poblaciones con mejores características para su adaptación a condiciones de estrés comparado con los progenitores de la misma región.

El estrés de humedad reduce severamente el índice de área foliar, peso seco, número de granos y rendimiento de frijol, pero las especies muestran alta recuperación en crecimiento y producción de vaina cuando se riegan después del tratamiento de sequía (Peña-Ramos y Muñoz-Orozco, 1988). La acumulación de ácido abscísico es indicador de la resistencia a la sequía en varios cultivos (Sindhu, *et al.*, 1990). El contenido de proteína está relacionado con la resistencia a la sequía, *P. acutifolia* se ha reportado como una especie resistente a la alta temperatura y sequía debido a que contiene un alto porcentaje de ésta (Frederici *et al.*, 1990).

Ramani, 1980 (citado por Moreno Limón, 1998) examinó la absorción y el transporte de zinc en variedades de sorgo, resistentes y susceptibles a la sequía

encontrando que no existen diferencias en ambas variables. Asimismo He *et al.*, (1993) citado por el mismo Moreno Limón, (1998) reporta acumulación de K^+ en raíces de sorgo bajo estrés osmótico inducido por PEG.

Al estudiar las respuestas en frijol *Phaseolus vulgaris* L. al estrés de sequía en etapa de plántula, Moreno Limón, (1998) reporta que en hoja y raíz, en la variedad flor de junio, los minerales Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe y Zn se incrementan con el tratamiento de sequía; pero que en tallo el Na, K, Mn y Fe se incrementan mientras que el Mg Ca y Zn disminuyen. Para pinto americano reporta que en hoja a excepción del Na que se incrementa, el resto de los minerales se reduce; en tallo se incrementan el Na y K y disminuyen el Mg, Ca, Mn, Fe y Zn; mientras que en la raíz el Na, Mg, K y Zn se disminuyen, en cambio el Ca, Mn y Fe se incrementan.

Sánchez, *et al.*, (1999) mencionan que el mantenimiento del turgor en condiciones de estrés hídrico está influenciado tanto por el ajuste osmótico (acumulación de solutos en el interior de las células) como por la elasticidad de la pared celular; al estudiar el mantenimiento del turgor y crecimiento epicotilos de guisante en presencia de diversas concentraciones de polietilenglicol (PEG 6000). A concentraciones bajas de PEG (equivalentes a - 0.1 y - 0.3 MPa) no se observó ninguna influencia de la capacidad de mantener el turgor sobre el crecimiento. En condiciones de estrés más severo (equivalente a -0.6 y - 1 MPa) las variedades con mayor capacidad de mantener el turgor mostraron crecimiento significativamente mayor; indican además que no parece que a estas concentraciones el PEG produzca efectos tóxicos, pues, cuando plantas después

del periodo de estrés, se colocaron de nuevo en presencia de agua destilada recuperaron su crecimiento.

Acumulación de prolina por efecto del estrés

La prolina, es uno de los aminoácidos contenidos en las proteínas de todos los organismos y de los tejidos de las plantas, es con frecuencia, acumulada en respuesta a varios tipos de estrés ambiental, como sequía (Naidu *et al.*, 1992; Stewart y Lee., 1974; Shing *et al.*, 1972), salinidad (Treichel, 1975), bajas temperaturas (Benko, 1986; Chu *et al.*, 1971), altas temperaturas (Oshanina,

1972) entre otros (Kathiresan, 1987). La evaluación de prolina, bajo este enfoque, se refiere al incremento de la concentración de prolina libre en el tejido, como consecuencia del estrés hídrico. Lo anterior se debe a que la incorporación de prolina en las proteínas, es inhibida durante del estrés hídrico, por influencia de la deshidratación del tejido sobre la síntesis de proteínas, con la consiguiente acumulación de prolina libre; además, algunos productos de la proteólisis durante el estrés, como el ácido glutámico y la arginina, son utilizados para la síntesis de más prolina libre (Paleg y Aspinall, 1981). Aunque no se conoce mucho acerca de la regulación de esta vía, se ha sugerido que la retroalimentación de prolina inhibe su propia síntesis (Ireland, 1990). Resulta interesante señalar que la habilidad de cultivos como cebada, tabaco y otros, para acumular prolina durante el estrés ha sido positivamente correlacionada con su resistencia a la sequía, por lo que, dicha acumulación de

prolina libre se recomienda como criterio de selección de plantas tolerantes al déficit hídrico (Singh *et al.*, 1972; Van Rensburg y Kruger, 1994).

Existen diversas interpretaciones al fenómeno de acumulación de prolina en las plantas como consecuencia de diferentes tipos de estrés, esto ha originado notables discrepancias en la descripción del papel funcional de dicho aminoácido en los tejidos vegetales. No obstante esta problemática, se ha puesto de manifiesto una importante utilidad en la presencia, acumulación y cuantificación de prolina en los vegetales, ya que se ha utilizado como un indicador confiable de selección de plantas (Flores, 1997).

El incremento en niveles de prolina durante estrés es único comparado con otros aminoácidos libres en el mismo tejido, pero similar a otros solutos de bajo peso molecular, como azúcares y ácidos orgánicos. El incremento en prolina está relacionado con un decremento en el potencial hídrico de la hoja y con otras medidas hídricas, como el contenido relativo de agua. (Sivaramakrishnan *et al.*, 1988). Revilla y Cañal (1999), mencionan que el concentraciones de NaCl 300 mM 300 (estrés salino) produce un enmarronamiento en callos de olivo y un incremento notable en prolina libre sobre todo en callos que proceden de un cultivo con manitol.

TÉCNICAS DE DESINFESTACIÓN

La importancia del mantenimiento de un medio ambiente estéril es fundamental durante el cultivo de tejidos vegetales para evitar la contaminación microbial, por lo cual; es necesario el uso de varias técnicas empleadas para la esterilización de cristalería, instrumentos quirúrgicos, líquidos y material vegetal. Los métodos

pueden ser clasificados como sigue: calor seco, calor húmedo (vapor bajo presión), ultrafiltración y esterilización química (Dodds y Lorin 1986).

Método de calor húmedo (vapor bajo presión: autoclave).

El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias, hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo. Este procedimiento emplea autoclave; la olla de presión común puede ser utilizada. Para esterilizar los materiales relacionados con el cultivo de tejidos se acostumbra usar una presión de 15 libras durante 15 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121⁰C (Roca y Mroginski 1991).

CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski 1991).

El callo es un tejido derivado de órganos o tejidos diferenciados, los cuales son llevados a una dediferenciación celular, presentando una proliferación celular continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de células. La inducción del callo a partir de una porción vegetal sucede cuando el inóculo ya estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga su crecimiento y una división celular continúa. Los reguladores de crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del

cultivo de callo son el ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftalén acético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 -D), en concentraciones que generalmente oscilan de 0.1 a 10.0 mg/L (Hurtado y Merino, 1988).

Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular (Butcher e Ingram, 1974 citado por Hurtado y Merino, 1988). La coloración de este tejido varía, aun derivando de la misma especie, el tipo y grado de pigmentación esta marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. Estudios microscópicos han demostrado que los tejidos de tipo callosa generalmente son heterogéneos en su composición celular; la diversidad celular presente en el callo depende de muchos factores como son el origen del tejido, la edad de los cultivos y la composición de los medios.

Las respuestas cualitativas y cuantitativas del crecimiento del callo en cultivo involucran un sinergismo estrecho y complejo entre el origen del tejido usado para la primera inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa (Dodds y Lorin, 1986). Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células ya que en general, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plantas completas (Myerson y Krull, 1982 citado por Hurtado y Merino, 1988).

OTROS ESTUDIOS REALIZADOS A PARTIR DE CULTIVO DE CALLO *IN VITRO*

Muchos autores (Shahin y Kanenko, 1986; Phillips y Luteyn 1983; Phillips y Hubtenberg, 1987) han logrado la regeneración de plantas completas a partir de cultivo de callo. Plántulas verdes fueron regeneradas desde callo inducido a 29°C (Jia, 1987).

Estudios *in vitro* involucrando selección y 3 subcultivos de 21 días cada uno de callo embriogénicos de maíz en medio basal N6 conteniendo NaCl 85 µM seguido por la regeneración y/o selección siguiente y subcultivos en mismo medio conteniendo NaCl 125 µM. Estas plántulas fueron regeneradas en medio conteniendo NaCl mostró 4 a 20 veces incremento en tamaño de raíz comparado con otro regenerado en medio libre de sal (Lupotto *et al.* , 1988).

La sensibilidad genotípica del callo a PEG es correlacionada positivamente con sensibilidad de sequía con plantas intactas. Sensibilidad de semilla y callo a PEG no fue correlacionada con sensibilidad a NaCl. En un estudio Mongodi *et al.*, (1988), líneas de callo derivados de embriones inmaduros de algunos genotipos no hubo éxito para supervivencia en medio conteniendo NaCl 0.05% pero las líneas F2 derivadas de la cruce de estos genotipos mostraron tolerancia a salinidad en cultivo de callo.

En otros estudios líneas de callo resistentes a NaCl fueron derivados desde 3 ciclos de subcultivo y fueron analizados para azúcares solubles y concentraciones de iones monovalentes después de 7 días de cultivo, en ambas condiciones, el testigo y en el medio con salinidad, las células sensitivas a sal contienen alta

concentración de azúcar comparado con las células resistentes a salinidad. Similarmente líneas de células estresadas con sal acumulan 1.3 veces más sodio comparado con líneas sensitivas, al contrario cambios en contenido de potasio fueron inconsistentes.

Kim y Song, (1984) estudiaron la respuesta genotípica a los requerimientos de cinetina en cultivos de callo *in vitro* de variedades de Korea de *Phaseolus vulgaris* L. Cultivos de callo de *Phaseolus vulgaris* L. fueron usados para examinar su habilidad de crecimiento en medio libre de cinetina. De 16 cultivares, ocho fueron calificadas como fenotipos completamente autónomo-cinetina y cinco fueron observados como fenotipos dependiente-cinetina.

Regeneración de plantas de callo derivado de protoplasto de mesófilo de *Phaseolus angularis* L. fue estudiada por Huang-Peiming y Ge-Koulin, (1989), los callos proliferaron por tres meses en medio MS; estos fueron transferidos a MS por otros tres meses. Brotes de tallo regenerados en MS adicionado con IAA a 0.1 mg/L , NAA 0.2 mg/L y 6 -BA 5 mg/L. En el medio anterior el brote no desarrolló. Tallos formados en un segundo medio crecieron de 3-5 cm de largo, estos fueron cortados de callo y transferidos en medio libre de hormonas o MS suplementado con IAA 1 mg/L. La formación de raíces fue inducida siete días después y posteriormente la planta completa fue obtenida.

Mohammed, *et al.*, (1992) reportan el desarrollo de un nuevo protocolo *in vitro* por inducción de brote múltiple y regeneración de plantas de explantes de ejes embrionicos de cuatro frijoles comunes (*Phaseolus vulgaris* L.) y dos líneas de frijol "tepari" (*P. acutifolius* A. Gray). Los explantes fueron preparados de dos tallos de embriones, 3 a 4 mm y 5 a 7 mm correspondientes de vainas colectadas a 15 y

25 días después de la floración respectivamente. El eje embriónico fue cultivado en medio basal Gamborg o B5 con BA 0, 5, 10 o 20 mM en combinaciones con NAA de 0,1 o 2 mM. Los cultivos de 24 a 25 °C bajo luz continua o incubados en oscuridad por 2 semanas seguida de luz continua antes de transferir a un segundo medio B5 (BA 0 a 2 mM ó BA 2 mM más GA3 4 mM). Raíces adventicias o tallos simples con raicillas formadas del explante cultivado en medio sin reguladores de crecimiento. Múltiples brotes fueron inducidos en todos los medios con BA, pero se produjeron más con 5 a 10 mM en muchas líneas. La incubación en oscuridad aumentó la iniciación de brotación múltiple. Los vástagos de tallo no fueron producidos en medio que contuviera NAA solo o en combinación con BA. En el segundo medio, 6 de 8 tallos por explante de frijol común y arriba de 20 tallos por explante del frijol "tepari" fueron observados después de tres semanas. Plantas maduras y fértiles fueron inducidas de esos brotes.

VI. METODOLOGÍA

DESCRIPCIÓN DEL AREA DE TRABAJO

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Celular y Genética, Química Analítica, Botánica, Bioquímica Microbiana y la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizaron cuatro variedades comerciales de *Phaseolus vulgaris* L. "frijol" (pinto americano, pastilla, flor de mayo y flor de junio).

DESINFESTACIÓN Y GERMINACIÓN

Las semillas de frijol se desinfestaron superficialmente con alcohol etílico al 70% por 30 segundos, posteriormente se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaClO) al 15 % (v/v) y unas gotas de Tween 20 (detergente no iónico) por 10 minutos. Se eliminó el agente desinfectante dentro de la campana de flujo laminar y se enjuagó el material de 3 a 5 veces con agua destilada esterilizada.

El material desinfectado se sembró en frascos con capacidad de 150 mL conteniendo como sustrato aproximadamente 30 mL de agar-agar al 0.7% esterilizado a 121^o C y 15 libras de presión por 15 minutos; dentro de la campana de flujo laminar para asegurar las condiciones asépticas del cultivo. Los cultivos se mantuvieron a fotoperíodo de 16 hrs. y a una temperatura de 26 ± 1^o C.

INDUCCIÓN DE CALLO IN VITRO

De las plántulas obtenidas *in vitro* se tomaron explantes de 1 cm de hipocotilo, hoja cotiledonaria, cotiledón y raíz, los cuales se sembraron asépticamente en recipientes de vidrio con capacidad de 120 mL con aproximadamente 30 mL de medio de cultivo MS (Murashige-Skoog 1962), complementado (en mg/L) con vitaminas, 100 mio-inositol, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0 y 10 de 2,4-D (para la inducción de callo *in vitro*) y agar-agar al 0.7%. El pH se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1 N ó HCl 0.1 N previa adición al agar y se llevó a esterilizar en olla de presión a una temperatura de 121 ± 1^o C y a 15 libras de presión por 15 minutos. El instrumental utilizado en la disección fue flameado constantemente para asegurar las condiciones asépticas que deben prevalecer dentro de la campana de flujo laminar. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 16 horas y a una temperatura de 26 ± 1^o C.

PRUEBAS DE ESTRÉS A SALINIDAD EN CALLO IN VITRO

Las concentraciones de salinidad utilizadas fueron de acuerdo a Lupotto *et al.*, (1988) y Moreno Limón (1998). Secciones de callo *in vitro* fueron subcultivados

en recipientes de vidrio de capacidad de 120 mL con aproximadamente 30 mL de medio de cultivo sólido MS (utilizado para la primera inducción), al que se le agregaron soluciones de cloruro de sodio a diferentes concentraciones (0.1 y 0.15 M) para estrés de salinidad. Cada prueba se realizó con sus respectivos testigos.

PRUEBAS DE ESTRÉS A SEQUÍA EN CALLO *IN VITRO*

1.- Las concentraciones de Polietilenglicol (PEG 6000) para producir el estrés de sequía en los subcultivos de callo *in vitro* en las cuatro variedades comerciales de frijol utilizadas en esta investigación se determinaron de la siguiente manera: Semillas de frijol pinto americano fueron sembradas en 6 concentraciones de PEG (-0.002, -0.02, -0.2, -0.6, -1, -1.5 Mpa) según gráfica de relación entre molalidad de PEG de cuatro pesos moleculares y ψ_w (potencial hídrico) medidos por método de déficit de presión-vapor de Steuter *et al.*, (1981). Dicha siembra se realizó en cámara bioclimática (condiciones controladas de luz y temperatura) en vasos de poliuretano de 300 ml de capacidad usando perlita como sustrato. Se les proporcionó un único riego con agua (120 mL) y a las 72 horas se les dio un riego (220 mL) con el tratamiento respectivo de PEG en medio MS líquido. Cada tratamiento constó de 6 repeticiones y dos testigos; uno con riego de agua y otro con medio líquido MS (1962) sin PEG.

Determinadas las concentraciones de PEG (10 y 15 % que equivalen aproximadamente a -0.6 y -1 Mpa respectivamente), se continuó con el desarrollo de la investigación.

2.- Secciones de callo *in vitro* fueron subcultivadas en tubos de ensaye de 18 x 150 en medio de cultivo líquido MS (utilizado para la primera inducción), con soporte de papel filtro; según Roca y Mroginsk (1991) con dos concentraciones de polietilenglicol (PEG) (10 y 15 %) para inducción de sequía. Cada prueba se realizó con sus respectivos testigos.

A los callos sometidos a estrés de salinidad y de sequía; y a sus testigos se les realizaron las siguientes pruebas:

Determinación de macro y micro nutrientes (AOAC, 1991)

Por espectrofotometría de emisión por plasma digestión vía seca en el instrumento ICAP 61E TRACE ANALYZER TERMO JARRELL ASH.

Los callos subcultivados *in vitro* sometidos a estrés de salinidad y sequía y sus respectivos testigos se secaron en estufa HS-33 RIOS ROCHA a 65 °C hasta peso constante.

Muestras de aproximadamente 1 g se carbonizaron completamente sobre un tripié con triángulo de porcelana a fuego lento con la llama azul hasta ausencia total de humo y se calcinaron en una mufla a 500 °C durante 1 h. Las cenizas se disolvieron con 15 mL de HCl 20% pasando la solución a través de un embudo de filtración rápida provisto de un papel filtro Whatman No. 41. El filtrado se colectó en matraces de aforación de 25 mL. Se preparó un blanco reactivo consistente en 5 mL de HCL 20% aforado a 25 mL con agua bidestilada. Las muestras tratadas se analizaron en un espectrofotómetro de emisión por plasma de THERMO JARREL ASH bajo condiciones ya optimizadas.

DETERMINACIÓN DE PROLINA: (Zuñiga *et al.*,1989) y Bates(1973)

Muestras de 0.5 g de callo se homogenizaron en 10 mL de una solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3%, posteriormente se filtró la solución en un embudo de filtración rápida utilizando papel filtro Whatman No. 2. Una alícuota (2 mL) se colocó en un tubo de ensaye al que se le agregaron 2 mL de ácido ninhídrico y 2 mL de ácido acético glacial para después colocar el tubo a una temperatura de 100° C durante una hora. Finalmente la reacción se completó en un baño de hielo. Se agregó 4 mL de tolueno y el contenido del tubo se invirtió suavemente durante 20 segundos. Posteriormente se aspiró la parte de tolueno con una pipeta, se estabilizó a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro visible Turner Sequoia 690. Se utilizó un tubo con tolueno como blanco para calibrar el aparato.

La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de calibración y se calculó sobre la base de peso fresco de la siguiente manera:

$$\frac{\text{(ppm de prolina de la curva)} \times \text{volumen de aforación}}{\text{g de material peso fresco}} = \text{ppm de prolina}$$

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS.-(SDS/PAGE)(Laemmli 1970)

Procesamiento de la muestra:

Medio gramo de callo fresco de cada variedad se maceró y sonicó en tubos

epperdorf (2.5 mL) con agua bidestilada y una solución desnaturalizante (buffer de lisis) (10 % de β -mercaptoetanol, SDS al 5 % (p/v), 0.01 % de azul de bromofenol, glicerol al 20 % (p/v) y Tris al 1.5 % con un pH de 6.8) en proporción 1:1 a 3 ciclos de 30 seg cada uno, con intervalos de descanso (30 seg). En los callos sometidos al estrés de sequía se probó además buffer fosfato-citrato pH 3.0 (Van Loon, 1976 citado por Van Loon, *et al.*, 1983). Posteriormente se centrifugaron a 13000g por 5 minutos. El sobrenadante se calienta en baño María a 100 °C por 3 minutos. La separación de proteína específica se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida- sds- discontinuo y en un solo sentido (unidimensional); metodología descrita por Laemmli (1970). con ligeras modificaciones. Una alícuota de 10 μ L de cada muestra y marcadores se sometió a electroforesis en un gel separador de poliacrilamida-SDS al 12 % y con un gel concentrador al 4% en una cámara Hoefer (modelo Mighty Small II SE 250/ SE 260). Se corrió el gel a 15 mA (miliampers) para el gel concentrador y 30 mA para el gel separador.

Después de la electroforesis, el gel se coloca en ácido tricloroacético al 12.5 % durante 30 minutos, se lava con agua y se mantiene en una solución colorante (azul Coomassie R-250 al 0.1 % (p/v), metanol al 50 % y ácido acético al 10%) durante 12 a 14 horas con agitación continua. Para eliminar el exceso de colorante, el gel se colocó en ácido acético al 10 %. Como marcadores de peso molecular se utilizan: (97.4 kDa Phosphorylase b, Rabbit Muscle, 66 kDa Albumin, Bovine, 45 kDa Albumin, egg, 29 kDa Carbonic Anhidrase, Bovine Erythrocytes, 24 kDa Trypsinogen, Bovine Pancreas 20 kDa Trypsin Inhibitor, Soybean 14,200 kDa α - Lactalbumin, Bovine Milk y 6,500 kDa Aprotinin, Bovine Lung) estándares

de la compañía Sigma Chemical CO.(todos los materiales utilizados son grado reactivos). Posteriormente se procedió a realizar los cálculos de peso molecular, tanto para las bandas de las muestras como para los estándares de peso molecular.

ULTRAESTRUCTURA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

(M.E.T) (Lux 1987).

Secciones de callo *in vitro* estresados a salinidad y sequía se fijaron en una solución de glutaraldehído (5%) preparada con Buffer fosfatos 0.1M, pH 7.2, por un lapso de 24 a 48 hrs. Las muestras se extrajeron y se lavaron con una solución de Buffer de fosfatos de 0.15 M para eliminar el exceso de glutaraldehído, luego se colocaron en una solución de tetraóxido de osmio preparada en un Buffer fosfatos 0.1 M durante 2 a 3 horas. Posteriormente las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30 -100 %). La acetona presente en el tejido se sustituyó utilizando concentraciones de Oxido de Propileno (3:1, 1:1, 1:3, acetona: óxido de propileno). Las muestras se infiltraron en resina Spurr en concentraciones crecientes. Se realizaron cortes semifinos de grosor variable (entre 0.5 y 1 μm), los cuales se tiñen con "Epoxy Tissue Stain" de Electrón Microscopy Sciences, Co U.S.A., el cual contiene fucsina básica y azul de toluidina. Estos cortes se observaron a través de microscopio óptico.

Finalmente se obtuvieron cortes ultrafinos (60-90 nm) los que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes obtenidos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-9.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE DATOS

Para la inducción de callo *in vitro* y las pruebas de estrés salinidad y sequía, se aplicó un diseño de bloques completamente aleatorio con veinte repeticiones. Para macro y micronutrientes se utilizó un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones para cada elemento.

Los datos cuantitativos sobre el desarrollo del callo, la determinación de macro y microelementos así mismo el efecto de factores de estrés salinidad y sequía, se sometieron a un paquete statgraphics versión 7.0 donde se aplicó el análisis de varianza múltiple sobre los tratamientos y macro y micronutrientes para detectar si existen diferencias significativas entre los factores y los tratamientos. Los valores promedio fueron comparados mediante la aplicación de comparación de medias de Tukey (Zar, 1996).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESINFESTACIÓN Y GERMINACIÓN

De las semillas de frijol, de las cuatro variedades comerciales, (pinto americano, pastilla, flor de mayo y flor de junio) desinfestadas y sembradas en agar, se obtuvieron, después de siete días plántulas asépticas vigorosas y de un color verde brillante, con raíces abundantes, largas y de color blanco a crema (figura 1).

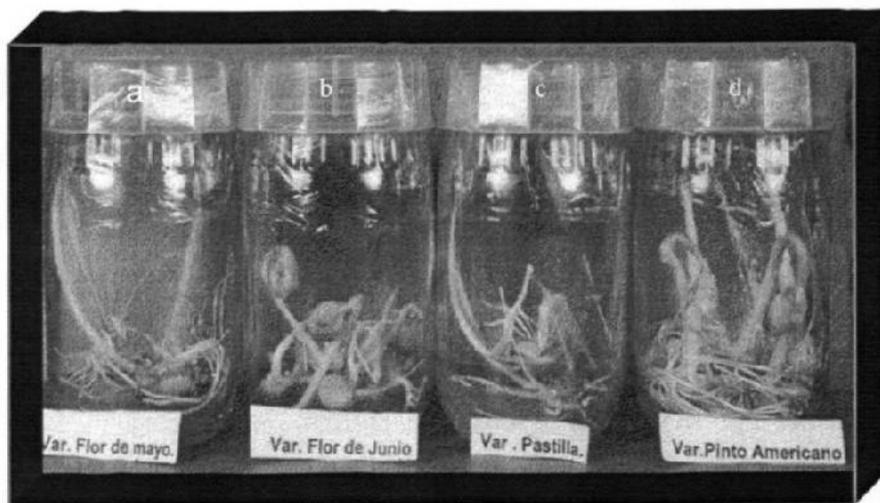


Figura 1. Plántulas asépticas de frijol de las variedades a) flor de mayo b) flor de junio c) pastilla y d) pinto americano.

INDUCCIÓN DE CALLO *IN VITRO*

El inicio de formación de callo *in vitro* se observó en las cuatro variedades de frijol utilizadas, a los siete días del cultivo *in vitro*, siendo más notoria en las variedades pinto americano, pastilla y flor de mayo en los explantes aéreos (hipocotilo, cotiledón y hoja cotiledonaria) en las cinco concentraciones de 2,4-D utilizadas, tal como lo citan Hurtado y Merino (1988) que los reguladores de crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo de callo son el ácido indol -3- acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4 -dichlorofenoxiacético (2,4 -D), en concentraciones que generalmente oscilan de 0.1 a 10.0 mg/L. En el explante de raíz no se obtuvo inducción de callo *in vitro*, tal como lo mencionan Dodds y Lorin, (1985) que las respuestas involucran un sinergismo entre el origen del tejido usado y la composición del medio y como lo reporta Kim y Song (1984) que clasifica cultivares de frijol completamente autónomo-cinetina, como se manifiesta entre los explantes utilizados en esta investigación. Los callos de mayor crecimiento son a los 30 días en (2,4-D); 3 mg/L en el explante de hipocotilo, en 10 mg/L en el de cotiledón y en 5 mg/L en el explante de hoja cotiledonaria (figura 2).

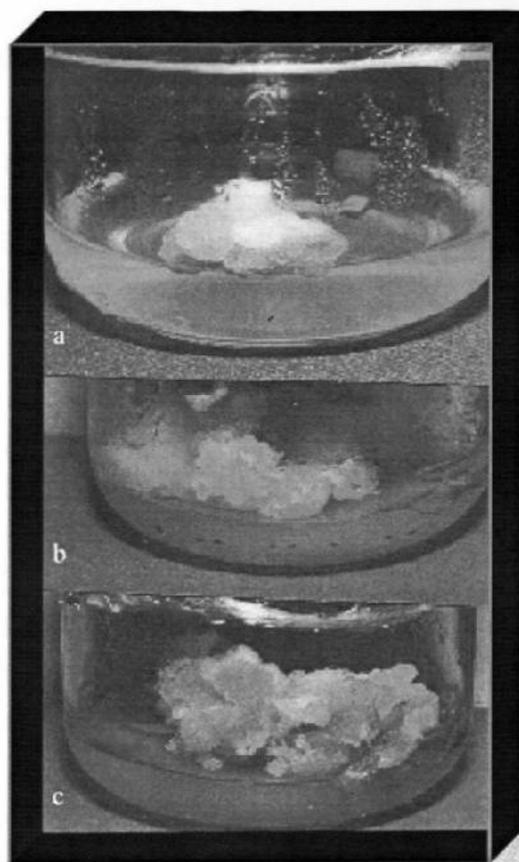


Figura 2. Callos *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. de 30 días sembrados en medio de cultivo MS con 2,4-D (mg/L): a) hipocotilo (3 mg/L), b) hoja cotiledonaria (5 mg/L) y c) cotiledón (10 mg/L).

Estos callos son friables, de color blanco a amarillo claro y sin signos de oxidación. Además se observó la formación de largas raicillas (3 a 5 cm) de color blanco en callo *in vitro* en las variedades pinto americano y flor de mayo. Como el explante de hoja cotiledonaria (Fig. 3), proporciona la mayor cantidad de inóculos para la inducción del callo *in vitro* en 5 mg/L de 2,4-D y éstos son de mayor cantidad y muy buena calidad; la exposición a los estrés salinidad y

sequía; y las determinaciones bajo estas condiciones se realizaron solo en estos callos *in vitro* (ver Figura 2c).



Figura 3. Inducción de callo *in vitro* en medio MS. a) explante de hoja cotiledonaria b) callo de 15 días, c) 21 días y d) 30 días.

PRUEBAS DE ESTRÉS A SALINIDAD Y SEQUÍA

Los callos *in vitro* de 30 días de hoja cotiledonaria (5 mg/L de 2,4-D) de las cuatro variedades de frijol fueron subcultivados en el medio M-S con las dos concentraciones de cloruro de sodio (0.1 y 0.15 M) para estrés de salinidad y dos concentraciones de polietilenglicol (PEG) (10 y 15 %) para inducción de sequía osmótica, después de 30 días bajo estrés, no aumentaron su tamaño, se tornaron color café claro y se volvieron menos friables (Fig. 4 y 5), lo que coincide con lo reportado por Broetto *et al.*, (1995) citados por Maiti, *et al.*, (2000) que en tensión-NaCl el tratamiento redujo crecimiento relativo en cultivo de tejidos; a su

vez Yang *et al.*, (1990) citado por Mir Araujo (1996) reportaron que callo de sorgo crecido en MS líquido con 0.05, 0.1 y 1.5 M de NaCl, después de dos semanas el tratamiento de NaCl dio una coloración café a los callos. También Revilla y Cañal (1999) mencionan que concentraciones de sal de 300 mM producen enmarronamiento en los callos de olivo cultivados en sacarosa.

En esta investigación pudimos observar que el cambio de coloración en los callos se debe a la respuesta a ambos factores de estrés ya que callos (de las cuatro variedades) sometidos a ambos estrés, se transfirieron nuevamente al medio original de inducción (M-S con 2,4-D 5 mg/L) y se observó el desarrollo de nuevo callo con las mismas características del callo de la primera inducción. Esto coincide con lo citado por Sánchez *et al.*, (1999) quienes mencionan que mismas concentraciones de PEG (-0.6 y -1 MPa) al parecer no producen efectos tóxicos, pues plantas de guisante después de ser sometidas a este estrés, se colocaron de nuevo en presencia de agua destilada y recuperaron su crecimiento.

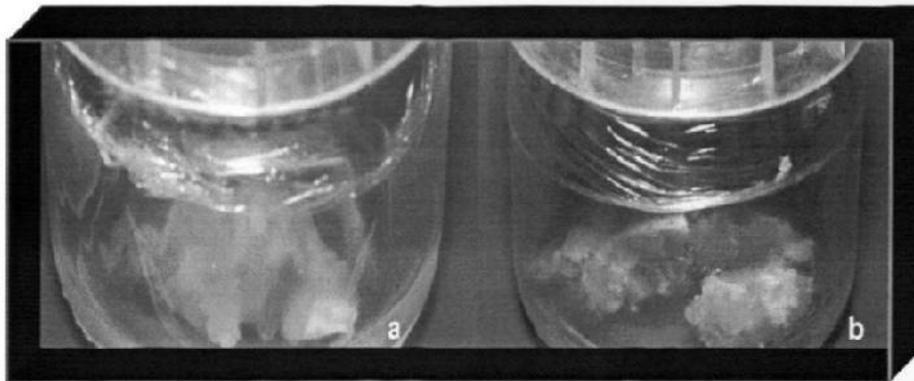


Fig. 4 Callo *in vitro* var. flor de mayo a) Control b) Tratamiento NaCl 0.15 M

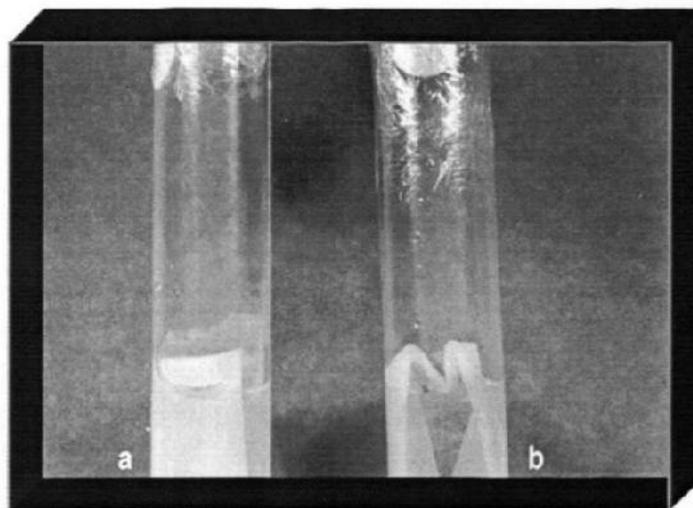


Fig. 5 Callo *in vitro* var. Pastilla a) Tratamiento PEG 10 %
b) Tratamiento PEG 15 %.

DETERMINACIÓN DE MACRO Y MICRO NUTRIMENTOS EN LOS CALLOS *IN VITRO* DE *Phaseolus vulgaris* L. PARA EL ESTRÉS DE SALINIDAD

Los resultados correspondientes a macro y micronutrientes en los callos *in vitro* se sometieron a un análisis de varianza múltiple. Dicho análisis reveló diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos y entre las variedades en la mayoría de los macronutrientes y micronutrientes. Enseguida se discutirán los resultados para cada uno de los macro y micronutrientes en los callos *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L.

SODIO (Na).-Para el sodio el análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variedades y ($P < 0.01$) entre los tratamientos (Tabla 1). En la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey (Tabla 2) respecto a las variedades observamos la formación de dos grupos; en el primer grupo se encuentran las variedades pastilla, flor de junio y flor de mayo, y en el segundo grupo las variedades flor de junio, flor de mayo y pinto americano, tenemos entonces que entre las variedades pinto americano y pastilla existen diferencias estadísticamente significativas; y es la variedad pinto americano la que presenta una mayor cantidad de sodio (16616.54 ppm). Con respecto a los tratamientos se observan también dos grupos, en el primero se incluyen los tratamientos testigo y NaCl 0.1M y en el segundo grupo el tratamiento NaCl 0.15M, de esta manera observamos diferencias estadísticas entre el testigo y el NaCl 0.15 M y entre el tratamiento NaCl 0.1 M y NaCl 0.15 M. Sin embargo no se observó diferencias significativas entre el testigo y el tratamiento NaCl 0.1 M (Figuras 6 y 7). Estos resultados en

donde observamos un aumento en la concentración de Na en el tratamiento NaCl 0.15 M, coinciden con los resultados obtenidos por Komizerko *et al.*, (1988) citado por Maiti, *et al.*, (2000) quienes mencionan que en subcultivos de callo en medio con NaCl, el Na⁺ aumentó en el tejido y con Broetto *et al.*, (1995) y Sawires *et al.*, (1997) citados por Maiti, *et al.*, (2000) quienes informaron respectivamente que en tensión-NaCl, callo cultivado en medio de MS con NaCl 0-1.2% se observó que las concentraciones de sodio aumentaron con concentraciones de salinidad creciente, lo cual era lo esperado.

TABLA 1. Análisis de varianza para sodio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	6.78E8	3	2.06E8	3.15 *	P = 0.03
TRATAMIENTO	1.78E9	2	8.93E8	13.68 **	P < 0.01

** Valores altamente significativos (P < 0.01) *valores significativos (P < 0.05) NS = Valor no significativo (p > 0.05).

TABLA 2. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para sodio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pasilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTÁNDAR	LÍMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 16616.54 ± 6358.61 a*	11113.13	22119.95
	2 5153.76 ± 800.90 b	349.65	10657.17
	3 12749.56 ± 2414.00 ab	7245.55	18253.38
	4 12450.68 ± 2267.61 ab	6947.26	17954.09
	Total 11742.74 ± 1803.52		
TRATAMIENTO	1 4305.80 ± 667.66 b*	-459.29	9072.90
	2 9715.85 ± 2253.29 b	4949.75	14481.95
	3 21205.56 ± 3742.51 a	16439.46	25971.66
	Total 11742.74 ± 1473.07		

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (p < 0.05). ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas (P > 0.05).

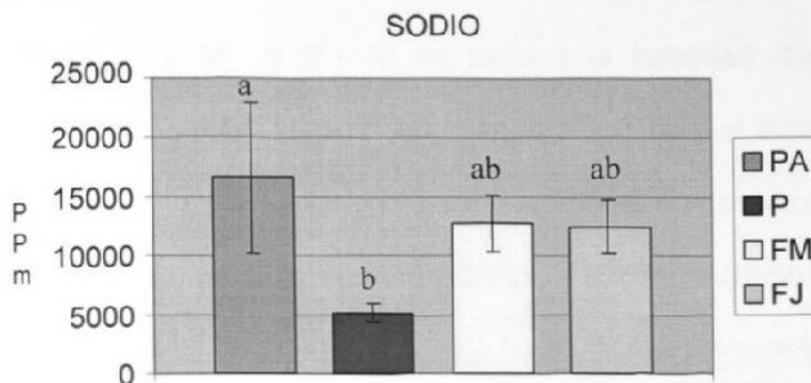


Fig. 6 Contenido de sodio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L bajo estrés de salinidad.

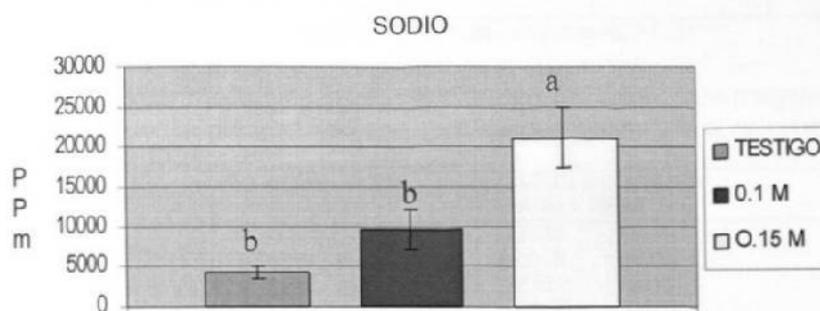


Fig. 7 Contenido de sodio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria en *Phaseolus vulgaris* L en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

MAGNESIO (Mg).- El contenido de Mg varía de la manera muy significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos pero no entre las variedades. ($P > 0.05$) como lo indica la Tabla 3. Respecto a las variedades; la comparación múltiple de medias de Tukey (Tabla 4) muestra la formación de un solo grupo, lo que indica la ausencia de diferencias estadísticas significativas, se presenta una captación de este elemento que va de 325.35 ppm en la variedad flor de mayo hasta 666.60 ppm en la variedad flor de junio. En relación a los tratamientos se observaron dos grupos en el primer grupo se muestran los tratamientos con NaCl 0.1 M y 0.15 M; en el segundo grupo el tratamiento testigo, lo que nos indica que existe diferencia significativa entre estos tratamientos con el testigo y

no entre los tratamientos NaCl 0.15 M y 0.1 M. Se puede observar que con los tratamientos NaCl 0.15 M y 0.1 M se reduce la cantidad de Magnesio acumulado de 306.57 y 464.31 ppm en comparación con el tratamiento de control (822.14 ppm) (Fig. 8 y 9). Lo cual puede significar que se ve afectado el Mecanismo de captación de este elemento debido a la concentración de NaCl.

TABLA 3. Análisis de varianza para magnesio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	738164.50	3	246054.83	2.20 NS	P = 0.10
TRATAMIENTO	1674894.8	2	837447.42	7.50 **	P < 0.01

** Valores altamente significativos ($p < 0.01$) * Valores significativos ($P < 0.05$) NS = Valor no significativo ($P > 0.05$).

TABLA 4. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para magnesio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO \pm ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 468.87 \pm 134.55 a **	241.42	696.32
	2 663.20 \pm 184.87a	435.75	890.66
	3 32535 \pm 85.67 a	97.90	552.80
	4 666.60 \pm 100.65a	439.15	894.05
	Total 531.01 \pm 66.02		
TRATAMIENTO	1 822.14 \pm 54.64 a *	625.16	1019.12
	2 464.31 \pm 158.09 b	267.33	661.29
	3 306.57 \pm 54.50 b	109.59	503.55
	Total 531.01 \pm 58.50		

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). **Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$).

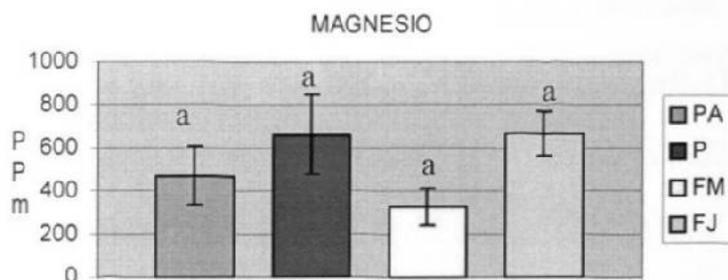


Fig. 8 Contenido de magnesio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

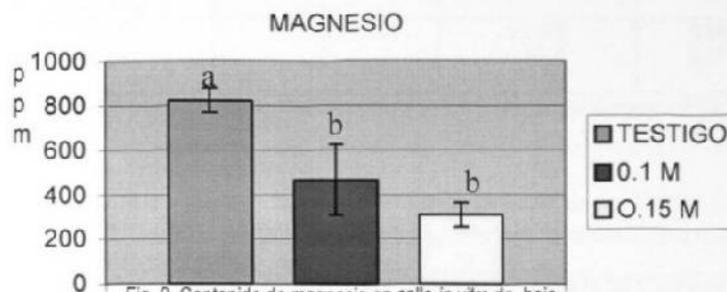


Fig. 9 Contenido de magnesio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

POTASIO (K).- de acuerdo al análisis de varianza no se muestran diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre las variedades ni entre los tratamientos (Tabla 5). En la comparación múltiple de medias de Tukey para las variedades y los tratamientos (Tabla 6), existe la formación de un solo. Se presenta una captación de este elemento que va de 18410.49 ppm en la variedad pinto americano, hasta 29782.76 ppm en la pastilla. Se puede observar que para pinto americano hay una interrelación entre el contenido de Na^+ y K^+ pues el Na^+ aumenta mientras que el K^+ disminuye y en la variedad pastilla se observa una disminución de Na^+ , mientras que el K^+ se incrementa ; lo cual puede ser debido al gradiente de potencial eléctrico de la membrana. En los tratamientos NaCl 0.15 y 0.1 M se observa menor cantidad de potasio (18465.07 y 25397.74 ppm) con respecto al testigo (28139.73 ppm) como lo indican las Figuras 10 y 11. Nuestros resultados coinciden con Sawires *et al.*, (1997) citado por Maiti, *et al.*, (2000) que informan que la concentración de K^+ en callo disminuyó con nivel de NaCl y difiere de (Komizerko *et al.*, 1988) citado por Maiti, *et al.*, (2000) quienes mencionan que en subcultivos de callo en medio con NaCl; el contenido de K^+ , aumenta en el tejido.

TABLA 5. Análisis de varianza para potasio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	6.25E8	3	2.08E8	1.66 NS	P = 0.19
TRATAMIENTO	5.96E8	2	2.98E8	2.37 NS	P = 0.11

** Valores altamente significativos (P < 0.01) *valores significativos (P < 0.05) NS = Valor no significativo (P > 0.05).

TABLA 6. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para potasio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 18410.49 ± 2834.65 a **	10782.00	26038.99
	2 29782.76 ± 6939.84 a	22154.27	37411.26
	3 22356.13 ± 1297.01 a	14727.64	29984.62
	4 25454.00 ± 1644.95 a	17825.50	33082.49
	Total 24000.85 ± 1945.90		
TRATAMIENTO	1 28139.73 ± 813.06 a **	21533.26	34746.20
	2 25397.74 ± 5284.78 a	18791.27	32004.21
	3 18465.07 ± 2162.00 a	11858.60	25071.54
	Total 24000.85 ± 1922.50		

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas (P > .05)

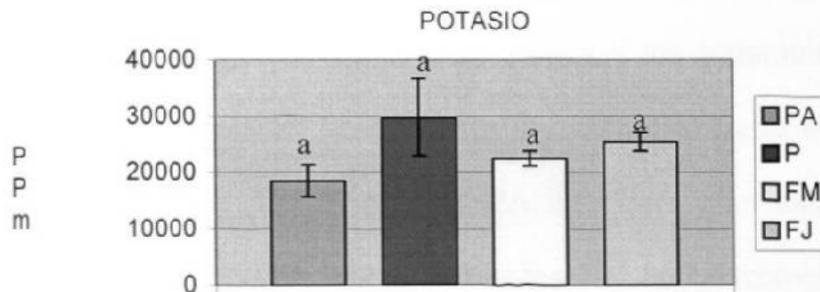


Fig. 10 Contenido de potasio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

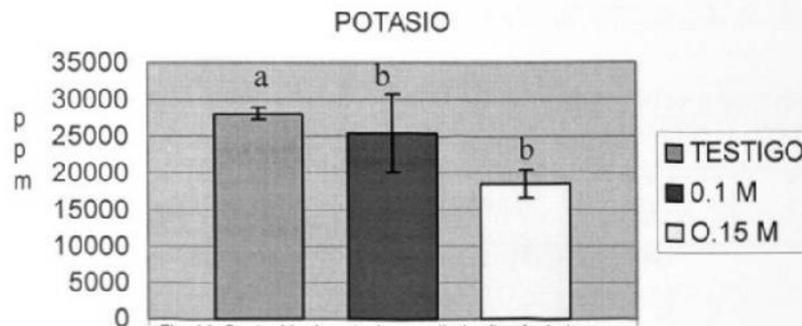


Fig. 11 Contenido de potasio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

CALCIO (Ca)- El contenido de Ca entre las variedades y tratamientos demostraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) como indica la Tabla 7. Las comparaciones múltiples de medias de Tukey (Tabla 8) pone en evidencia la formación de dos grupos para las variedades, en el primero se encuentran las variedades flor de mayo y flor de junio y en el segundo grupo las variedades pinto americano y pastilla. La prueba de Tukey demuestra igualmente diferencias estadísticamente significativas entre las variedades pinto americano y pastilla con las otras variedades; donde la variedad pinto americano es la que presenta la mayor cantidad de Ca que es de 3113.55ppm mientras que la variedad flor de mayo, alcanza únicamente 853.08 ppm. Con respecto a los tratamientos se observan también dos grupos, en donde el tratamiento NaCl 0.1 M comparte ambos grupos y los tratamientos testigo y NaCl 0.15 M se encuentran en diferente grupo, por lo tanto es entre estos últimos tratamientos en donde se observan las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$); (Figs. 12 y 13) estos resultados coinciden con los obtenidos por Komizerko *et al.*, 1988 citado por Maiti, *et al.*, (2000) quienes mencionan que en subcultivos de callo en medio de NaCl, la cantidad de Ca ^{**} aumenta en el tejido.

TABLA 7. Análisis de varianza para calcio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	2830197	3	9433732.3	15.36 **	$P < 0.01$
TRATAMIENTO	9029798	2	4514399.0	7.35 **	$P < 0.01$

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$) *valores significativos ($P < 0.05$) NS = Valor no significativo ($P > 0.05$).

TABLA 8. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para calcio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 3113.55 ± 373.01 a *	2580.03	3647.06
	2 2402.56 ± 439.69 a	1869.04	2936.08
	3 853.08 ± 213.57 b	319.57	1386.60
	4 1329.29 ± 55.77 b	795.78	1862.81
	Total 1924.62 ± 154.35		
TRATAMIENTO	1 1336.14 ± 80.99 b *	874.10	1798.18
	2 1877.59 ± 460.79 ab	1415.55	2339.63
	3 2560.13 ± 367.47 a	2098.10	3022.17
	Total 1924.62 ± 198.30		

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$)

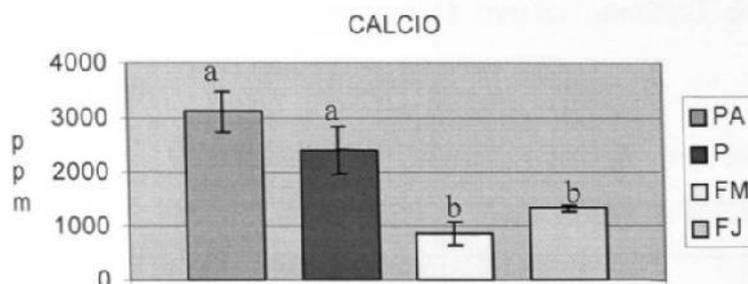


Fig. 12 Contenido de calcio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

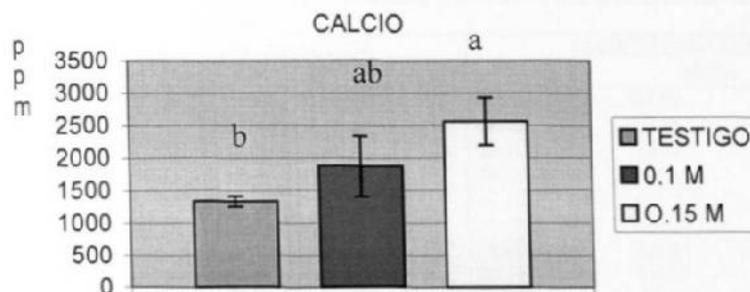


Fig. 13 Contenido de calcio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

MANGANESO (Mn).- Para el manganeso se presentan diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) tanto en las variedades como entre los tratamientos (Tabla 9). Con respecto a los resultados obtenidos en comparaciones múltiples de medias de Tukey (Tabla 10) podemos observar que para las variedades existe la formación de 3 grupos; en el primero se encuentran las variedades flor de mayo y flor de junio, en el segundo las variedades flor de junio y pinto americano y en el tercero las variedades pinto americano y pastilla. La mayor cantidad de Mn se encuentra en la variedad 2 con 173.90 ppm mientras que la variedad flor de mayo con 57.27 ppm registra la menor cantidad (Fig. 14). En relación a los tratamientos, se establecen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los 3 tratamientos, ya que esto se encuentra en grupos diferentes. La mayor cantidad de Mn se encuentra en el tratamiento testigo con 183.91 ppm mientras que la menor cantidad de 63.00 ppm se encuentra en el tratamiento NaCl 0.15 M (Fig. 15).

TABLA 9. Análisis de varianza para manganeso en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	66599.72	3	22199.90	13.85 **	$P < 0.01$
TRATAMIENTO	89680.89	2	44840.45	27.99 **	$P < 0.01$

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$)

TABLA 10. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para potasio en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO + ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 137.74 ± 20.34 ab *	110.49	164.99
	2 173.90 ± 18.67 a	146.65	201.15
	3 57.27 ± 20.35 c	30.01	84.52
	4 103.96 ± 27.12 bc	76.71	131.22
	Total 108.63 ± 8.00		
TRATAMIENTO	1 183.91 ± 9.46 a *	160.31	207.51
	2 107.74 ± 26.31 b	84.14	131.35
	3 63.00 ± 9.29 c	39.40	86.61
	Total 118.22 ± 9.82		

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$)

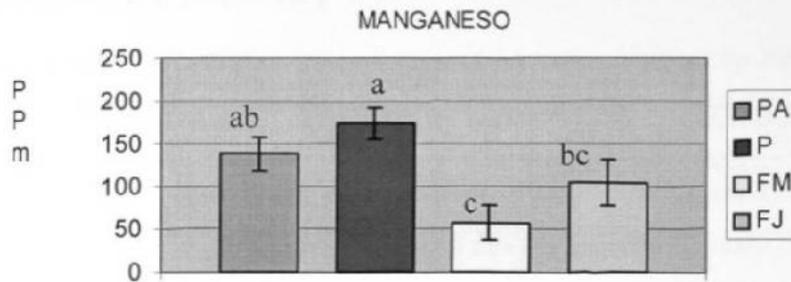


Fig. 14 Contenido de manganeso en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

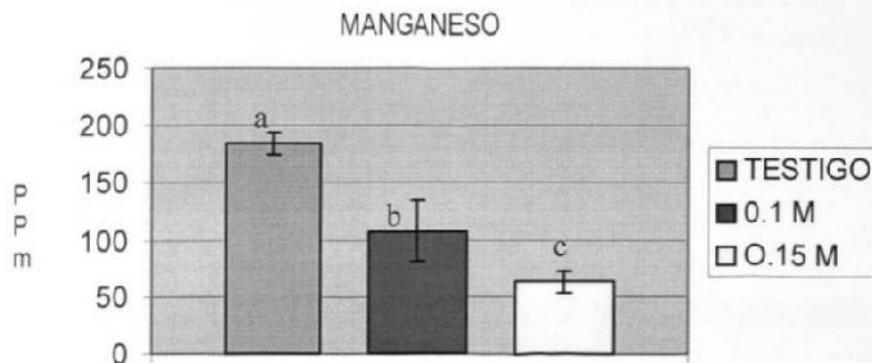


Fig. 15 Contenido de manganeso en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

MOLIBDENO (Mo).- Con respecto al Mo solo se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades mientras que para los tratamientos no se muestran dichas diferencias (Tabla 11). Las comparaciones múltiples de medias de Tukey (Tabla 12) para las variedades, podemos observar la formación de dos grupos en donde se encuentran las variedades flor de mayo y flor de junio en el primero y en el segundo grupo las variedades pinto americano y pastilla, por lo que tenemos que estas últimas variedades difieren estadísticamente de las variedades flor de mayo y flor de junio. Para los

tratamientos se formó un solo grupo lo que indica que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$), (Figs. 16 y 17).

TABLA 11. Análisis de varianza para molibdeno en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	300.96	3	100.32	6.68 **	$P < 0.01$
TRATAMIENTO	34.87	2	17.43	1.16 NS	$P = 0.32$

** Valores altamente significativos ($p < 0.01$) * Valores significativos ($p < 0.05$) NS = Valor no significativo ($p > 0.05$).

TABLA 12. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para molibdeno en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO \pm ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 7.30 ± 1.98 a *	4.66	9.93
	2 6.86 ± 1.58 a	4.22	9.50
	3 1.37 ± 0.34 b	-1.26	4.00
	4 1.24 ± 0.40 b	-1.39	3.88
	Total 4.19 ± 0.64		
TRATAMIENTO	12.86 ± 0.02 a **	0.57	5.14
	25.20 ± 1.80 a	2.92	7.49
	34.51 ± 1.56 a	2.23	6.80
	Total 5.44 ± 0.85		

* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$)

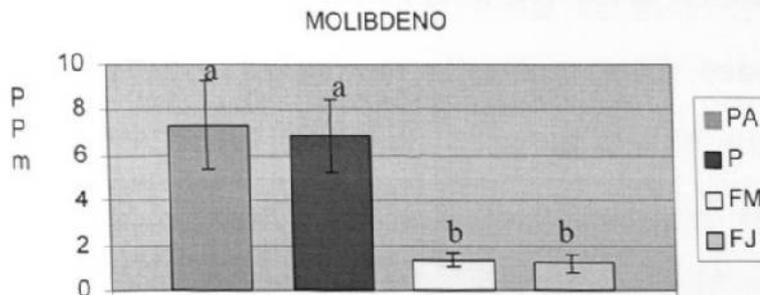


Fig. 16 Contenido de molibdeno en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

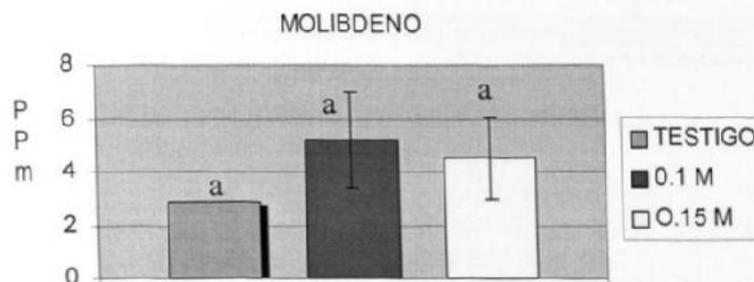


Fig. 17 Contenido de molibdeno en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

FIERRO (Fe).- Al igual que el molibdeno, el contenido de fierro demostró una *variación altamente significativa* ($P < 0.01$) entre las variedades. El análisis de varianza reveló que para los tratamientos no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Tabla 13). De acuerdo a los resultados obtenidos mediante las comparaciones múltiples de medias de Tukey (Tabla 14) las variedades flor de mayo y flor de junio forman un grupo en comparación con las variedades flor de junio y pastilla. Existe la presencia de un tercer grupo que corresponde a las variedades pastilla y pinto americano. De esta manera tenemos que la variedad pinto americano difiere estadísticamente de las variedades flor de mayo y flor de junio pero no de la variedad pastilla. De igual manera se observan diferencias entre las variedades pastilla y flor de mayo para el contenido de fierro. La variedad que muestra la mayor cantidad de Fe es la pinto americano con 429.56 ppm en contraste con la variedad flor de mayo que presenta solamente 119.98 ppm. Respecto a los tratamientos no se muestran diferencias estadísticas entre ellos, ya que se encuentran en un mismo grupo los valores de este análisis estadístico (Figuras 18 y 19).

TABLA 13. Análisis de varianza para fierro en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	596042.67	3	198680.89	9.38 **	$P < 0.01$
TRATAMIENTO	53128.70	2	26564.35	1.25 NS	$P = 0.29$

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$) * Valores significativos ($P < 0.05$) NS = Valor no significativo ($P > 0.05$).

TABLA 14. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para fierro en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 429.56 ± 73.84 a *	330.47	528.65
	2 406.20 ± 42.87 ab	307.10	505.29
	3 119.98 ± 32.67 c	20.88	219.07
	4 223.42 ± 34.68 bc		
	Total 294.79 ± 24.44		
TRATAMIENTO	1 334.14 ± 28.54 a **	248.32	419.96
	2 307.55 ± 73.10 a	221.73	393.37
	3 242.67 ± 56.29 a	156.86	328.49
	Total 294.79 ± 32.19		

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$)

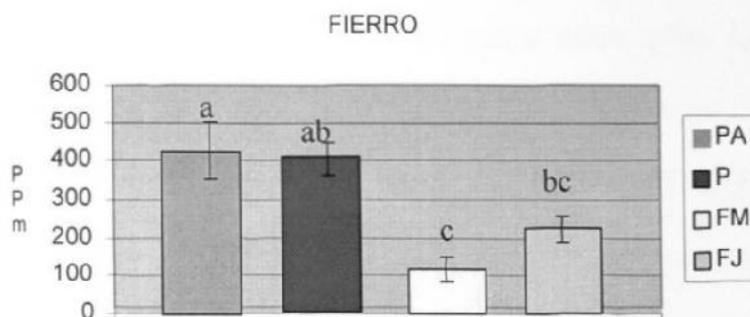


Fig. 18 Contenido de fierro en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

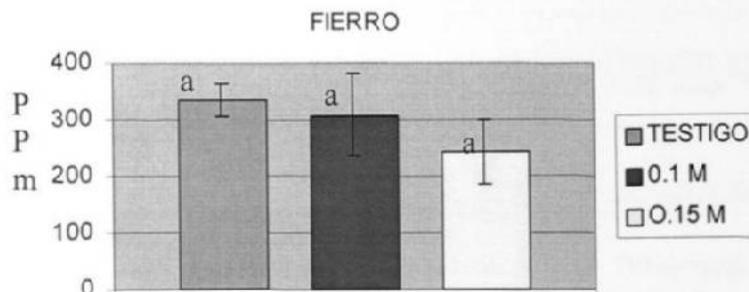


Fig. 19 Contenido de fierro en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl

COBRE (Cu).-El cobre demostró las mismas variaciones que el fierro donde se presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variedades. Sin embargo dichas diferencias para los tratamientos no fueron significativas (Tabla 15). De la comparación múltiple de medias de Tukey (Tabla 16) se establece la existencia de 2 grupos; donde, en el primer grupo están las variedades flor de mayo, flor de junio y pastilla mientras que las variedades flor de junio, pastilla y pinto americano en el segundo grupo; por lo que solo difieren estadísticamente las variedades pinto americano y flor de mayo entre ellas. La variedad pinto americano presenta la mayor cantidad de Cu (13.05ppm), mientras que la variedad flor de mayo registra la cantidad (2.53 ppm). Con respecto a los tratamientos no se observan diferencias estadísticas, ya que los valores de esta variable en los tratamientos se encuentran en un mismo grupo (Figs. 20 y 21). Sin embargo se observó mayor acumulación de Cu en los tratamientos que en el testigo.

TABLA 15. Análisis de varianza para cobre en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	754.74	3	251.58	3.97 *	$P < 0.05$
TRATAMIENTO	171.87	2	86.93	1.35 NS	$P = 0.27$

** Valores altamente significativos ($P < 0.01$) * Valores significativos ($P < 0.05$) NS = Valor no significativo ($P > 0.05$)

TABLA 16. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para cobre en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTÁNDAR	LÍMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 13.05 ± 4.1 ^a *	7.64	18.47
	2 12.13 ± 3.55 ^{ab}	6.72	17.55
	3 2.53 ± 0.53 ^b	-2.88	7.95
	4 4.63 ± 0.54 ^{ab}	-0.78	10.04
	Total 8.08 ± 1.34		
TRATAMIENTO	1 5.02 ± 0.34 ^a **	0.33	9.71
	2 9.94 ± 3.46 ^a	5.25	14.63
	3 9.30 ± 2.82 ^a	4.61	13.99
	Total 8.08 ± 1.49		

* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas ($P > 0.05$)

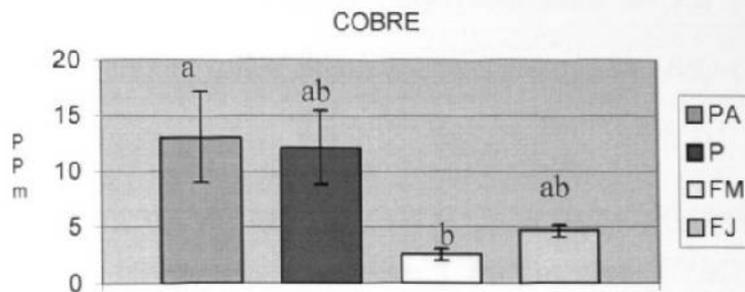


Fig. 20 Contenido de cobre en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

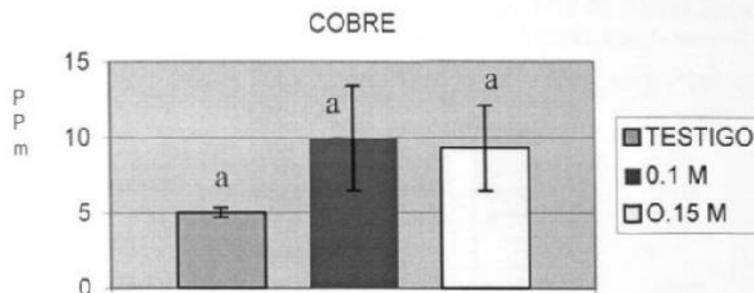


Fig. 21 Contenido de cobre en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

ZINC (Zn)- El zinc presentó comportamientos distintos que el fierro y cobre donde observamos una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las variedades (Tabla 17). Respecto a las variedades en la comparación múltiple de medias de Tukey (Tabla 18) confirma que todas quedan incluidas en un mismo grupo. Podemos observar también que para los tratamientos, se muestra la formación de dos grupos. En el primer grupo están los tratamientos NaCl 0.15 M y NaCl 0.1 M y en el segundo grupo los tratamientos testigo y NaCl 0.1M

demostrando así, que los tratamientos testigo y NaCl 0.15 M son estadísticamente diferentes al tratamiento NaCl 0.1M ; siendo el tratamiento testigo en donde se encuentra la mayor cantidad de Zn (84.11 ppm) y el tratamiento NaCl 0.15 M presenta la menor cantidad (41.58) (Figs. 22 y 23).

TABLA 17. Análisis de varianza para zinc en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	3953.18	3	1317.72	0.89 NS	P = 0.45
TRATAMIENTO	10648.98	2	5424.49	3.68 *	P = 0.03

** Valores altamente significativos (P < 0.01); * Valores significativos (P < 0.05) NS = Valor no significativo (P > 0.05)

TABLA 18. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para zinc en callo *in vitro* de frijol estresados a salinidad. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo 2) NaCl 0.1 M y 3) NaCl 0.15 M.

N. VEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 61.37 ± 11.47 a **	35.24	87.50
	2 78.70 ± 22.05 a	52.57	104.83
	3 49.24 ± 5.07 a	23.11	75.37
	4 62.13 ± 10.97 a	35.0	88.26
	Total 62.86 ± 6.91		
TRATAMIENTO	1 84.11 ± 4.19 a *	61.48	108.74
	2 62.88 ± 16.76 ab	40.28	85.51
	3 41.58 ± 8.11 b	18.96	64.21
	Total 62.86 ± 6.34		

* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05) ** Letras iguales en columnas indican diferencias no significativas (P > 0.05)

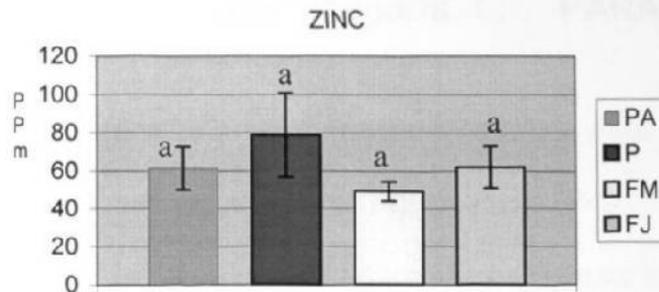


Fig. 22 Contenido de zinc en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

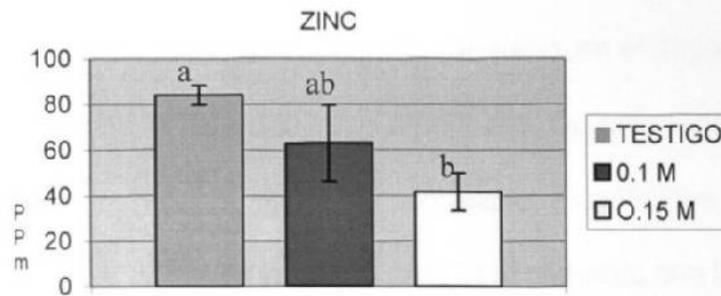


Fig. 23 Contenido de zinc en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

DETERMINACIÓN DE PROLINA LIBRE EN LOS CALLOS *IN VITRO* DE *Phaseolus vulgaris* L. PARA EL ESTRÉS DE SALINIDAD

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para el contenido de prolina libre muestran diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades y los tratamientos (Tabla 19). La comparación múltiple de medias de Tukey (Tabla 20) para las variedades muestra la formación de tres grupos, incluyendo en el primero a las variedades flor de mayo y flor de junio, en el segundo a la variedad pastilla y en el tercero la variedad pinto americano. De esta manera tenemos que la variedad pinto americano presenta diferencias estadísticas significativas con las otras variedades y que la variedad pastilla la presenta con las variedades flor de mayo y flor de junio. En general la mayor concentración de prolina libre se presenta en la variedad pinto americano (0.160 ppm) mientras que la menor concentración la presenta la variedad flor de mayo con 0.034 ppm. (Fig. 24). Respecto a los tratamientos tenemos que en un primer grupo se encuentran los tratamientos NaCl 0.1 y 0.15 M y en un segundo grupo los tratamientos NaCl 0.1 y el testigo; tenemos entonces que las diferencias significativas se presentan entre los tratamientos testigo y NaCl 0.15 M, con una disminución en el contenido de prolina en los dos tratamientos con respecto al testigo (Fig. 25) lo que difiere de lo mencionado por Sawires *et al.*, (1997) citado por Maiti *et al.*, (2000) que reportan que la prolina libre generalmente aumenta con salinidad creciente y también difiere de lo descrito por Sivaramakrishnan, *et al.*, (1988) y Revilla y Cañal (1999), que el estrés salino produce en callos de olivo un incremento notable en prolina libre; sobre todo en callos que proceden de un cultivo con

manitol.

TABLA 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROLINA LIBRE EN CALLO IN VITRO DE FRIJOL ESTRESADOS A SALINIDAD..

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	0.092	3	0.030	12.37 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	0.025	2	0.012	5.13 **	P = 0.01

** Valores altamente significativos (P < 0.01) * Valores significativos (P < 0.05) NS = Valor no significativo (P > 0.05)

TABLA 20. COMPARACIONES MULTIPLES DE MEDIAS MEDIANTE LA PRUEBA DE TUKEY PARA PROLINA LIBRE EN CALLO IN VITRO DE FRIJOL ESTRESADOS A SALINIDAD.

Varietades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) 0.1 M de NaCl y 3) 0.15 M de NaCl.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 0.160 ± 0.026 a *	0.12	0.19
	2 0.087 ± 0.023 b	0.05	0.12
	3 0.034 ± 0.005 c	0.0001	0.06
	4 0.038 ± 0.011 c	0.04	0.07
	Total 0.080 ± 0.009		
TRATAMIENTO	1 0.112 ± 0.021 a	0.08	0.14
	2 0.080 ± 0.027 ab	0.05	0.11
	3 0.047 ± 0.008 b	0.01	0.07
	Total 0.080 ± 0.011		

* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (p < 0.05).

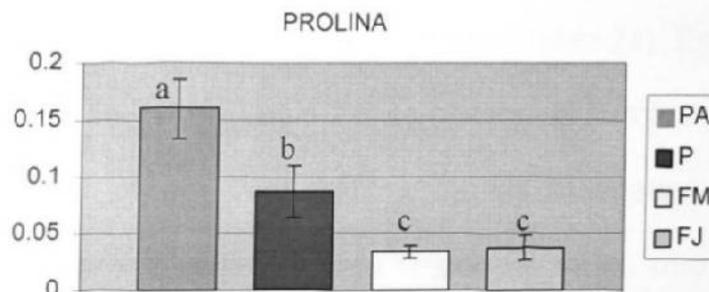


Fig. 24 Contenido de prolina libre en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de salinidad.

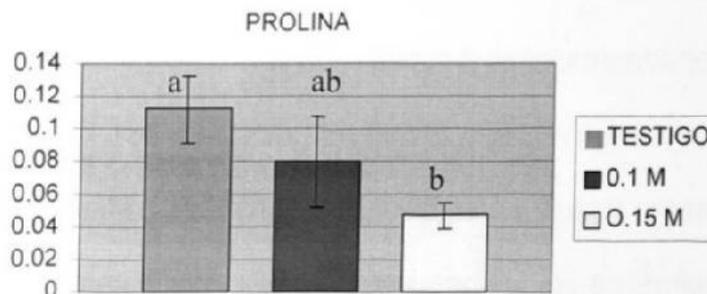


Fig. 25 Contenido de prolina libre en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de salinidad con NaCl.

DETERMINACIÓN DE MACRO Y MICRONUTRIMENTOS EN LOS CALLOS *IN VITRO* DE *Phaseolus vulgaris* L. PARA EL ESTRÉS DE SEQUÍA

Al igual que para el factor salinidad, los resultados correspondientes a macro y micronutrientes en los callos *in vitro* estresados a sequía fueron sometidos a un análisis de varianza múltiple. Dicho análisis reveló diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos y entre las variedades en la mayoría de los macronutrientes y micronutrientes. Enseguida se discutirán los resultados para cada uno de los macro y micronutrientes en los callos *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L.

SODIO.- Para la determinación del sodio el análisis de varianza pone en evidencia la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades, asimismo entre los tratamientos (Tabla 21). En la comparación múltiple de medias de Tukey (Tabla 22) se observa la formación de dos grupos para las variedades; en el primer grupo están las variedades pastilla, flor de mayo y flor de junio y la variedad pinto americano en el otro grupo. De esta manera tenemos que la variedad pinto americano difiere estadísticamente de las otras 3 variedades. Esto se refleja en la cantidad de sodio ya que los valores van desde 3478.05 ppm en la variedad pinto americano; y de 1484.07 ppm en la variedad flor de junio. Podemos observar también que para los tratamientos la comparación múltiple de medias de Tukey mostró la formación de dos grupos, un primer grupo que corresponde a los tratamientos PEG 10 y 15 % y en el segundo el tratamiento testigo demostrando esta agrupación que existen diferencias estadísticamente significantes entre estos grupos. Siendo

en el tratamiento testigo mayor la cantidad de este elemento al registrar 4306.80 ppm, en comparación con 739 ppm que se captan con el tratamiento PEG 15% (Figs. 26 y 27). Esto difiere con lo citado por Moreno Limón (1998) que menciona que en variedades de frijol flor de junio y pinto americano en tallo y hoja hay un aumento de sodio al estresar plántulas de frijol a sequía.

Tabla 21. Análisis de varianza para sodio en callo *in vitro* de frijol estresados a sequía.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VAR. EDAD	24983322	3	8327774	6.33 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	92985495	2	46492747	35.34 **	P < 0.01

** Valores altamente significativos (P < 0.01); * Valores significativos (P < 0.05); NS = Valor no significativo (P > 0.05)

TABLA 22. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para sodio en callo *in vitro* de frijol estresados a sequía. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) PEG 10 % y 3) PEG 15 %.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 3478.05 ± 1168.67 a *	2697.12	4258.98
	2 1701.32 ± 259.48 b	930.39	2482.25
	3 1506.91 ± 402.31 b	725.98	2287.84
	4 1484.07 ± 494.49 b	703.14	2265.00
	Total 2042.59 ± 339.07		
TRATAMIENTO	1 4306.80 ± 667.66 a *	3630.49	4983.10
	2 739.02 ± 32.75 b	62.71	1415.32
	3 1081.94 ± 203.37 b	405.64	1758.25
	Total 2042.59 ± 232.90		

*Letras diferentes en columnas indicar diferencias significativas (P < 0.05). **Letras iguales indican diferencias no significativas (P > 0.05)

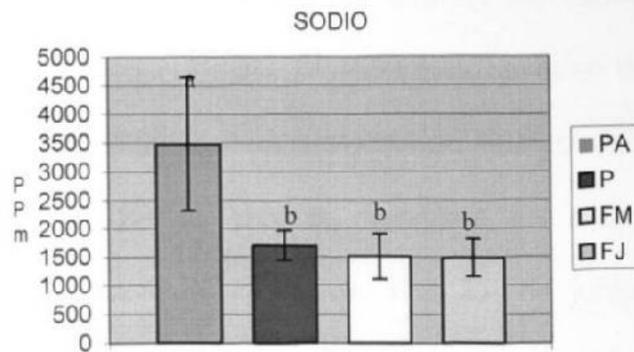


Fig. 26 Contenido de sodio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de sequía con PEG.

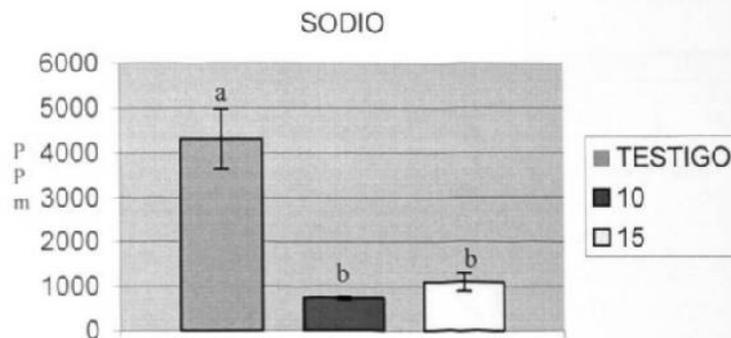


Fig. 26 Contenido de sodio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de sequía con PEG.

MAGNESIO (Mg).- El magnesio tuvo una variación tanto entre las variedades ($P < 0.05$) como entre los tratamientos aplicados ($P < 0.01$). (Tabla 23) Respecto a las variedades; las comparaciones múltiples de medias de Tukey (Tabla 24) muestran dos grupos, un primer grupo que corresponde a las variedades flor de mayo, pastilla y pinto americano y un segundo a las variedades pinto americano y flor de junio. En relación a los tratamientos se formaron también dos grupos, en el primero se encuentran los tratamientos PEG 15% y 10% y el segundo corresponde al tratamiento testigo por lo cual se desprende que hay

diferencias significativas solo entre el tratamiento testigo con el resto de ellos. Se puede observar al respecto que cuando los callos son tratados con los tratamientos PEG 15% y 10% se reduce la cantidad de Mg (573.88 y 523.59 ppm) en comparación con el tratamiento testigo (822.17) (Figs. 28 y 29). Moreno Limón (1998) al respecto menciona que a dicho estrés aumenta la cantidad de Mg en hoja y raíz de frijol flor de junio y disminuye en pinto americano en hoja, raíz y tallo.

TABLA 23. Análisis de varianza para magnesio en callo *in vitro* de frijol estresados a sequía.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	174673.45	3	58224	3.69 *	P = 0.02
TRATAMIENTO	613307.58	2	306653.79	19.45 **	P < 0.01

** Valores altamente significativos (P < 0.01) * Valores significativos (P < 0.05) NS = Valor no significativo (P > 0.05)

TABLA 24. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para magnesio en callo *in vitro* de frijol estresados a sequía. Variedades: 1) pinto americano, 2) pestiña, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo 2) PEG 10% y 3) PEG 15%.

NIVEL	PROMEDIO + ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA	
VARIEDAD	1 671.14 ± 69.56 ab*	585.65	756.62
	2 600.44 ± 34.55 b	514.96	685.92
	3 552.20 ± 50.88 b	466.72	637.68
	4 735.73 ± 80.51 a	650.25	821.21
	Total 639.88 ± 30.70		
TRATAMIENTO	1 822.17 ± 54.65 a*	748.14	896.20
	2 523.59 ± 18.52 b	449.56	597.61
	3 573.88 ± 39.67 b	499.85	647.91
	Total 639.88 ± 23.34		

* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05). ** Letras iguales indican diferencias no significativas (P > 0.05)

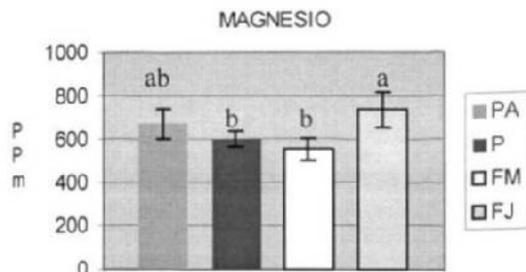


Fig. 28 Contenido de magnesio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de sequía con PEG.

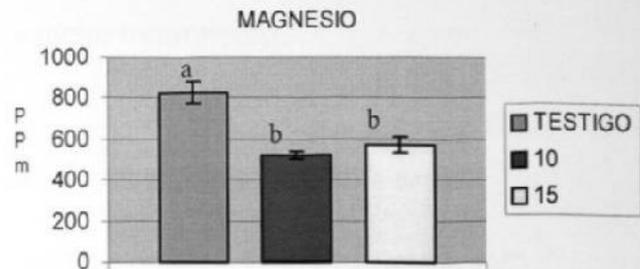


Fig. 29 Contenido de magnesio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria, de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de sequía con PEG.

POTASIO (K).- Para el potasio existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variedades y entre los tratamientos. (Tabla 25). La comparación múltiple de medias muestra que las variedades flor de mayo y pinto americano forman un grupo mientras que las variedades pastilla y flor de junio corresponden a un segundo grupo. La mayor cantidad de K está en las variedades pastilla y flor de junio con 15623.89 y 16332.78 ppm respectivamente (Tabla 26 y Fig. 30). Respecto a los tratamientos en el primer grupo se encuentran PEG 10 y 15% y en el segundo el tratamiento testigo. (Fig. 31). Observando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre tratamiento testigo y los otros dos tratamientos. Mostrando de esta manera que ambos tratamientos PEG 10 y 15% disminuyen la capacidad de absorción de K al pasar de 28139.73 ppm en el testigo a 7383.53 y 7945.73 ppm en los

tratamientos 2 y 3 respectivamente. Lo cual coincide con Moreno Limón, (1998) quien reporta para este elemento una reducción, a nivel de raíz en la variedad pinto americano; pero se reporta un aumento a nivel de hoja y tallo al estrés de sequía; también difiere del mismo autor en que en la variedad flor de junio en general registra un aumento al someterse a dicho tratamiento.

TABLA 25. Análisis de varianza para potasio en callo *in vitro* de frijol estresados a sequía.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMÁ DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	PROBABILIDAD
VARIEDAD	8.29E7	3	2.76E7	10.65 **	P < 0.01
TRATAMIENTO	3.35E9	2	1.67E9	646.49 **	P < 0.01

Valores altamente significativos (P < 0.01), * Valores significativos (P < 0.05) NS = Valor no significativo (P > 0.05)

TABLA 26. Comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey para potasio en callo *in vitro* de frijol estresados a sequía. Variedades: 1) pinto americano, 2) pastilla, 3) flor de mayo y 4) flor de junio. Tratamientos 1) testigo, 2) PEG 10 % y 3) PEG 15 %.

NIVEL	PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR	LIMITE DE CONFIANZA PARA LA MEDIA
VARIEDAD	1 13222.69 ± 2905.84 b*	12125.72 14319.65
	2 15623.89 ± 3357.07 a	14526.93 16720.86
	3 12778.94 ± 3542.61 b	11681.974 13875.90
	4 16332.78 ± 3927.50 a	15235.81 17429.74
	Total 14489.57 ± 1726.43	
TRATAMIENTO	1 28139.73 ± 813.06 a*	27189.73 29089.73
	2 7383.53 ± 314.58 b	6433.53 8333.53
	3 7945.46 ± 676.85 b	6995.46 8895.46
	Total 14489.57 ± 357.90	

*Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05) **Letras iguales indican diferencias no significativas (P > 0.05)

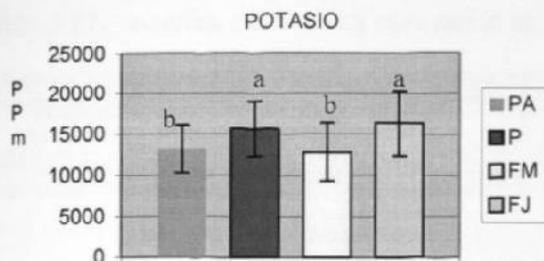


Fig. 30 Contenido de potasio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de 4 var. de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés de sequía con PEG.

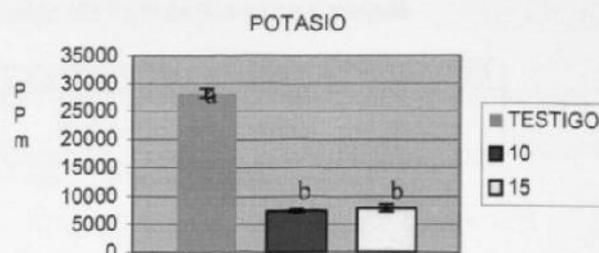


Fig. 31 Contenido de potasio en callo *in vitro* de hoja cotiledonaria de *Phaseolus vulgaris* L. en los diferentes tratamientos de sequía con PEG.

CALCIO (Ca).- De acuerdo con el análisis de varianza el contenido de calcio mostró que tanto para las variedades como para los tratamientos no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) (Tabla 27). La comparación múltiple de medias (Tabla 28) indica la formación de dos grupos; uno formado por las variedades pastilla, flor de junio y flor de mayo y otro por las variedades flor de junio, pastilla y pinto americano, por lo tanto es entre las variedades pinto americano y pastilla en donde se presentan las diferencias estadísticamente significativas y es en la variedad pinto americano donde se presenta la mayor cantidad de Ca que es de 1445.15 ppm y la menor de 1111.51 ppm en la variedad pastilla (Figs. 32 y 33). Con respecto a los tratamientos no se muestran diferencias estadísticas entre ellos ya que se observan en un mismo grupo los valores obtenidos para este análisis comparativo. Sin embargo Moreno Limón (1998) cita al respecto que el Ca se incrementa en las