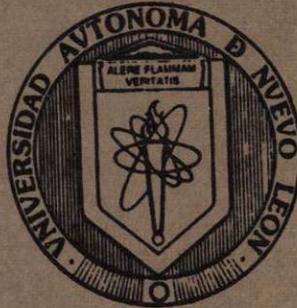


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



EVALUACION DE CALLOS DE DOS GENOTIPOS DE
FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) UTILIZAN-
DO EL METABOLITO TOXICO DEL HONGO Macro-
phomina phaseolina (Tassi) Goid.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA:

MARIO DIAZ LANDEROS

608

4

1

33

c.5

MARIN, N.L.

AGOSTO DE 1991.

T
SBC
.B
D5
C.



1080061836

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



EVALUACION DE CALLOS DE DOS GENOTIPOS DE
FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) UTILIZAN-
DO EL METABOLITO TOXICO DEL HONGO Macro-
phomina phaseolina (Tassi) Goid.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA:

MARIO DIAZ LANDEROS

T
SB 608

.B4

D5



040.633

FA4

1991

C.5

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA

T E S I S

"EVALUACION DE CALLOS DE DOS GENOTIPOS DE FRIJOL
(Phaseolus vulgaris L.) UTILIZANDO EL METABOLITO
TOXICO DEL HONGO Macrophomina phaseolina (Tassi)
Goid."

Elaborado por:

MARIO DIAZ LANDEROS

Aceptada y Aprobada como Requisito Parcial para
optar por el titulo de:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

COMITE SUPERVISOR DE TESIS:


BIOL. M.C. HAZAEL GUTIERREZ MAULEON
Asesor Principal


DRA. ELIZABETH CARDENAS CERDA
Asesor Auxiliar


Ph.D. EMILIO OLIVARES SAENZ
Asesor Estadístico

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Sr. Abel Díaz Rangel

Sra. Sofía Landeros de Díaz

Gracias porque siempre me han apoyado en todas mis decisiones, y fué por sus consejos, amistad y ayuda moral y económica que logré culminar mi carrera. GRACIAS.

A MIS HERMANOS:

Abel

Sergio

Elia Sofía

Verónica Cecilia

Por la confianza que tuvieron en mí y por mostrar interés en mis logros. Gracias por su amistad y cariño.

A mí novia:

Srita. IRMA ALICIA ALANIS TREVIÑO, por tu amor y comprensión, y sobre todo por haber compartido conmigo tanto -- los momentos difíciles como los momentos agradables.

Fe de Erratas

<u>Ubicación</u>	<u>Dice</u>	<u>Debe decir</u>
Agradecimientos, Párrafo 4º, primer renglón.	Jefa del Area de Microbiolo gía.	Jefa de los labo ratorios de Fito patología.
Página 20, Párrafo 2º, primer renglón	Según Huertado y Merino.	Según Hurtado y Merino.
Se omite el número de página 36, y se conti núa con la numeración normal.		
Página 59, Bibliografía número 12	Gutierrez, H., Miranda, I. y Gaona, H.	Gutierrez, H., Mir, I. y Gaona, H.

AGRADECIMIENTOS

Al BIOL. M.C. HAZAEL GUTIERREZ MAULEON, por su asesoramiento y apoyo en este trabajo de tesis.

Al Ph.D. EMILIO OLIVARES SAENZ, por su ayuda en los análisis estadísticos y revisión del trabajo.

A la DRA. ELIZABETH CARDENAS CERDA, por haber aceptado colaborar deinteresadamente en la revisión del presente escrito.

A la BIOL. M.C. LYDIA N. GONZALEZ SOLIS, Jefa del área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por su gran interés y apoyo durante el desarrollo de este -- trabajo.

A la ING. M.C. ADRIANA RAMOS G., por su amistad y ayuda brindada aún y después de finalizada esta investigación.

A la Generación 85-89 de Fitotecnia, a "la raza de las esca-
leras", por todos los momentos de amistad y estudio que com-
partieron conmigo,

A todos los Maestros de la Facultad de Agronomía.

A toda la Facultad de Agronomía.

INDICE

	Pág.
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	2
III. LITERATURA REVISADA.....	5
3.1. Podredumbre carbonosa del frijol.....	5
3.1.1. Nomenclatura y clasificación.....	5
3.1.2. Etiología.....	6
3.1.3. Epifitiología.....	7
3.1.4. Sintomatología en frijol.....	9
3.2. Mecanismo químico de ataque de los hongos fi- topatógenos.....	10
3.2.1. Enzimas.....	10
3.2.2. Toxinas.....	11
3.2.3. Enzimas y toxinas producidas por <u>M. -- phaseolina</u>	13
3.3. Cultivo de tejidos vegetales.....	16
3.3.1. Generalidades.....	16
3.3.2. Explante y desinfestación.....	19
3.3.3. Medio de cultivo.....	20
3.3.4. Ambiente requerido.....	23
3.3.5. Cultivo de callos.....	24
IV. MATERIALES Y METODOS.....	28
4.1. Materiales.....	28
4.2. Métodos.....	29
4.2.1. Multiplicación de <u>M. phaseolina</u> en me- dio líquido.....	29

	Pág.
4.2.2. Obtención del metabolito tóxico del pa tógeno.....	30
4.2.3. Inducción y mantenimiento de callos de frijol.....	31
4.2.4. Aplicación del metabolito tóxico del - hongo a los callos de frijol.....	32
4.2.5. Diseño estadístico.....	34
4.2.6. Evaluación de resultados.....	35
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
5.1. Resultados.....	39
5.1.1. Incremento en peso fresco.....	39
5.1.2. Grado de necrosis.....	40
5.2. Discusión.....	47
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
6.1. Conclusiones.....	50
6.2. Recomendaciones.....	51
VII. APENDICE.....	52
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	58

INDICE DE TABLAS, GRAFICAS Y FIGURAS

<u>TABLA:</u>	Pág.
1 Análisis de varianza para la variable incremento en peso fresco en callos de dos genotipos de frijol a los 21 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	41
2 Comparación de medias del incremento en peso fresco de callos de dos genotipos de frijol (en gramos) a los 21 días de expuestos en tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	42
3 Análisis de varianza para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	42
4 Comparación de medias de genotipos para la variable grado de necrosis en callos de frijol a los 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	43
5 Comparación de medias de los distintos niveles de metabolito tóxico para la variable grado de necrosis en callos de frijol a los 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	44

6	Análisis de varianza para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 14 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	44
7	Comparación de medias para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 14 días de expuestos a tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	45
8	Análisis de varianza para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	46
9	Comparación de medias para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de expuestos a tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u>	46
10	Medio utilizado para la inducción y mantenimiento de callo en los dos genotipos de frijol evaluados durante el experimento.....	53

GRAFICA:

Pág .

1	Relación del incremento en peso fresco y tres concen- traciones del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseo- lina</u> en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de exposición.....	54
2	Relación del grado de necrosis y tres concentracio- nes del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u> en callos de dos genotipos de frijol después de 7 días- de exposición.....	55
3	Relación del grado de necrosis y tres concentracio- nes del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u> en callos de dos genotipos de frijol después de 14 días de exposición.....	56
4	Relación del grado de necrosis y tres concentracio- nes del metabolito tóxico del hongo <u>M. phaseolina</u> en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de exposición.....	57

FIGURA:

1	Diagrama de flujo mostrando la secuencia seguida du- rante el desarrollo del experimento.....	38
---	--	----

I. RESUMEN

El presente trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y el financiamiento estuvo a cargo del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

Callo de dos genotipos de frijol, variedad Agrarista y línea LEF-1-RB, fueron expuestos al metabolito tóxico del hongo Macrophomina phaseolina (Tass) Goid agregado en el medio R3, -- donde las variables que se evaluaron fueron el incremento en peso fresco y el grado de necrosis. Se intentó evaluar el callo utilizando dos metodologías: en medio R3 sólido y en medio R3 líquido, pero dado al alto índice de contaminación presentado en la evaluación en medio líquido, únicamente se empleó medio R3 sólido. Para el incremento en peso fresco a los 21 días y para el grado de necrosis a los 7, 14 y 21 días respectivamente, en los callos se obtuvo que después de expuestos los callos al medio con metabolito tóxico se presentaron daños en el tejido, reflejados en un mayor grado de necrosis y en un menor incremento en peso fresco conforme se aumentó la concentración del metabolito tóxico en el medio R3. La línea LEF-1-RB mostró ser más tolerante al efecto del metabolito tóxico del hongo que la variedad Agrarista.

II. INTRODUCCION

El frijol común (Phaseolus vulgaris L.) se cultiva en todo el mundo y se considera junto con el maíz uno de los granos básicos en la dieta del pueblo Latinoamericano.

América Latina aporta más de un tercio de la producción mundial de frijol común, siendo los rendimientos promedio inferiores a los 600 kg/ha (22). En México, el área cultivada de frijol común es de aproximadamente dos millones de hectáreas -- con siembras que se realizan bajo condiciones de riego y de temporal. Sin embargo, algunas regiones del país presentan rendimientos muy bajos debido a varios factores limitantes, entre los cuales destacan la disponibilidad de agua, las plagas y las enfermedades (3).

Las enfermedades inciden directamente en el bajo rendimiento y calidad de los cultivos. Para combatirlas se utilizan muchos sistemas como prácticas culturales, rotación de cultivos, aplicación de pesticidas, mejoramiento genético, etc. Desafortunadamente, ninguno de estos sistemas de combate ha resuelto el problema de las enfermedades en forma definitiva.

Una de las enfermedades que atacan al frijol en México es la pudrición carbonosa del tallo y de la raíz, cuyo agente causal es el hongo Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. Este hongo se identificó como patógeno del frijol en el Norte de Tamaulipas. Está esparcido por casi todo el mundo, principalmente en las regiones de climas cálido con altos porcentajes de humedad (7).

Macrophomina phaseolina es un patógeno que ataca a más de 400 especies diferentes de plantas cultivadas y silvestres. En México se ha observado en 18 especies de importancia agronómica, y son evidentes las pérdidas causadas en ajonjolí (Guerrero), -- frijol (Sonora y Tamaulipas), melón (Guerrero, Jalisco, Michoacán, Sinaloa y Sonora), sandía (Nuevo León) y sorgo (Nuevo León, Tamaulipas y Sinaloa) (5).

Aunque la evaluación en el campo sigue siendo esencial en los programas de selección de variedades de plantas resistentes a enfermedades, muchas veces se presentan obstáculos insuperables de tipo climatológico, infecciones deficientes del patógeno, etc. Ello ha propiciado la búsqueda de nuevas técnicas de selección que dependan menos de factores ambientales y que proporcionen información igualmente confiable que las técnicas tradicionales. Una de estas técnicas es el uso del filtrado tóxico ó metabolito tóxico de hongos fitopatógenos, el cual se utiliza para evaluar material genético de especies vegetales en estado de plántula, o como en el caso de este trabajo de investigación, a nivel de cultivo de tejidos (específicamente callos), bajo condiciones de laboratorio. Lo anterior intenta proporcionar condiciones ideales de ambiente y de manejo, así como también ahorrar tiempo y espacio.

En el presente trabajo de investigación, se combinó la técnica del cultivo de tejidos (específicamente con callos de frijol) con la técnica del empleo de filtrados ó metabolitos tóxicos obtenidos de hongos fitopatógenos (en este caso de Macropho-

mina phaseolina (Tassi) Goid), en donde se consideró como objetivo principal evaluar la respuesta de callos de dos genotipos de frijol al metabolito tóxico de M. phaseolina.

III. LITERATURA REVISADA

3.1. Podredumbre carbonosa del frijol

3.1.1. Nomenclatura y clasificación.

La enfermedad que produce Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid recibe muchos nombres según sea el cultivo atacado: en sorgo, maíz y otras gramíneas se le conoce comúnmente como "pudrición carbonosa" (charcoal rot), lo mismo que en soya, papa y camote; en frijol "tizón ceniciento del tallo" (ashy stem blight) "pudrición gris de la raíz" y "pudrición negra"; en ajonjolí -- "pudrición del cuello y tallo"; otros nombres incluyen los de -- "pudrición o podredumbre de la base del tallo" y "pudrición o podredumbre del pie" (5).

El hongo M. phaseolina, es un Deuteromycete (Sphaeropsidales), presenta una fase esclerocial (Mycelia Sterilia) que se conoce con el nombre de Rhizoctonia bataticola (Taub.) Butler, aunque algunos autores lo catalogan como Sclerotium bataticola; en tanto que la otra forma es la picnidial conocida como M. phaseolina (6). Dhingra y Sinclair (6) señalan que actualmente esta fase se le conoce con los nombres de M. phaseolina (Tassi) Goid., M. phaseoli (Maubl.) Ashby y Botryodiplodia phaseoli (Maubl.) Thirum., sin embargo, sugieren como nombres adecuados R. bataticola a la forma esclerocial y M. phaseolina a la forma picnidial.

3.1.2. Etiología.

El hongo Macrophomina phaseolina tiene un micelio septado y profusamente ramificado. En medio de cultivo, el hongo produce colonias de varias tonalidades que van desde el blanco, - café y gris, hasta el negro, dándose esta última tonalidad -- cuanto más edad tiene el micelio.

La ramificación del micelio es generalmente en forma de - ángulo recto, pero se han observado ramificaciones en ángulo - agudo. La mayoría de las ramificaciones muestran una constriction característica al punto de unión y un septum separando la hifa lateral de la que le dió origen (6).

Los esclerocios son negros, lisos y varían de formas que - van desde esféricas a oblongas, e incluso de formas irregula--- res; en medio de cultivo o en la superficie del tejido de la -- planta son globulares, ovals o en forma de pera, mientras que - en tejido cortical los esclerocios tienden a ser aplanados (6). El tamaño de los esclerocios es variable, y de acuerdo con Hai- gh, citado por Dhingra (6), se pueden agrupar en tres grupos de acuerdo al tamaño de los esclerocios: Grupo "A" con esclerocios de 200 micras ó más; grupo "B" con esclerocios de 120 a 200 mi- cras y grupo "C" con esclerocios de 120 micras o menos.

Las picnidias se forman naturalmente en ciertos hospederos (no en todos), y usando algunos métodos especiales la formación de picnidias puede inducirse en medio de cultivo. En plantas - hospederas, las picnidias estan inmersas inicialmente en el te- jido, pero emergen al exterior al madurar. Estas son globosas,

ostioladas, de coloración oscura a grisácea. Las picnidiosporas son unicelulares, hialinas, de pared delgada, elongadas, - elípticas, algunas veces curvadas pero no tienen una verdadera curvatura. El tamaño de la picnidia y de las picnidiosporas es altamente variable no únicamente de una cepa a otra, si no dentro de una misma cepa (6).

En general, el crecimiento óptimo de Macrophomina phaseolina en medio de cultivo ocurre cuando hay temperaturas de 30- a 37°C. Hay poco ó nada de crecimiento con temperaturas de -- 10°C y 40°C. El hongo puede crecer sobre un amplio intervalo - de pH, siendo el óptimo entre 3.6 y 5.0. Así mismo, la exposi ción a la luz visible puede no tener efecto en el crecimiento- vegetativo y en la formación de esclerocios en medio de culti- vo, pero la luz directa del sol puede ser perjudicial para el- crecimiento del hongo (6). Short y Wyllie, citados por Díaz - Franco (7) señalan que el medio de cultivo donde M. phaseolina se desarrolla y forma abundante micelio y esclerocios es el me dio PDA.

Wyllie y Fry citados por Dhihgra (6) reportan que la trans ferencia constante del hongo en medio de cultivo trae como con secuencia la pérdida de su patogenicidad.

3.1.3. Epifitiología.

El inóculo de M. phaseolina consiste de esclerocios y picnidiosporas con micelio que generalmente no es considerado como parte de la densidad del inóculo. La fuente primaria de --

inóculo en el suelo son los esclerocios, existiendo fuera o dentro de la planta colonizada durante la fase parasítica del hongo (6).

M. phaseolina es considerado como "un patógeno de alta temperatura". La severidad de la enfermedad se presenta cuando -- existen temperaturas de 28 a 35°C. Sin embargo, hay casos en -- que la enfermedad sobrepasa este intervalo. Por ejemplo Edmund et al. citado por Dhingra (6), encontraron en el clima de Arizona que el intervalo de temperatura de 24 a 46°C indujo una severa pudrición carbonosa en sorgo; así mismo, la pudrición carbonosa de la soya en la India fue encontrada, y ocurre única-- mente, a temperatura entre 25 a 40°C. Durante 1929-1933 serios brotes de pudrición carbonosa en plántulas de frijol ocurrieron en casi todo los campos de frijol de California, en donde las -- plantaciones habían estado expuestas a altas temperaturas, con -- intervalo de 35 a 40°C y una media de 26.5°C (6).

Los suelos húmedos y la alta humedad relativa son dos im-- portantes factores que afectan al inóculo y a la potencialidad de la enfermedad. Para el desarrollo de M. phaseolina, la humedad del suelo es considerada como un factor de primera importan -- cia. La máxima infección ocurre cuando el suelo está seco y -- los cultivos estan en estado de plántula o cuando el grano está madurando. Los períodos secos que ocurren entre los dos esta-- díos anteriores no afectan el desarrollo de la enfermedad, mien -- tras las altas temperaturas y falta de agua entre 15 a 28 días -- después de la floración hacen a las plantas más susceptibles -- (6).

Como se mencionó anteriormente, el hongo habita en suelos de climas cálidos y ataca la raíz y tallos de más de 400 especies diferentes de plantas monocotiledoneas y dicotiledoneas. Las formas infectivas son las picnidiosporas y los esclerocios que sobreviven en el suelo y constituyen el inóculo primario. Las picnidias al formarse en el hospedero liberan las picnidiosporas, las cuales son llevadas por el viento e infectan a otras plantas. M. phaseolina penetra el tejido directamente mediante apresorios y lo invade intra o intercelularmente; además el patógeno produce enzimas pectolíticas y celulolíticas y toxinas de importancia en la patogénesis (5).

Los residuos de cosecha representan una importante forma de diseminación de la enfermedad y la perpetuidad del hongo durante años. Otra forma de diseminación es mediante semilla infectada, ya que el hongo se transmite a través de la semilla en la mayoría de los cultivos (5).

3.1.4. Sintomatología en frijol.

Los síntomas de la enfermedad se pueden presentar, en cualquier estadio de desarrollo de la planta. En plántula la enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones hundidas y oscuras, cerca del nudo cotiledona. Después en el hipocotilo ocurre un estrangulamiento, lo que provoca que la planta se marchite y muera. Varios autores coinciden en citar que en el tejido infectado aparecen picnidias y esclerocios, aunque en algunos casos solo se forman esclerocios (7). Dhin-

gra y Sinclair (6) reportaron que los síntomas observados en plántulas adultas de frijol fueron clorosis, raquitismo y muerte prematura. Al principio la lesión aparece en el tallo y muestra una coloración rojiza, posteriormente, cuando se forman los esclerocios y los picnidios negros, la coloración se torna gris. La infección también se observa en las ramas.

El período de incubación es largo, algunas veces requiere de 3 a 8 semanas antes de que una infección visible tome lugar, y 3-4 días para la formación de esclerocios (10).

3.2. Mecanismo químico de ataque de los hongos fitopatógenos

Aunque algunos patógenos utilizan la fuerza mecánica para penetrar en los tejidos de una planta, sus funciones como fitopatógenos son principalmente de naturaleza química. Por lo tanto, los efectos que ocasionan sobre las plantas son casi siempre el resultado de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo entre las sustancias que secretan el patógeno y las que contiene ó produce la planta (1).

Los principales grupos de sustancias que secretan los patógenos en las plantas y que al parecer participan en la aparición de una enfermedad, ya sea directa o indirectamente, incluye las enzimas y las toxinas (1).

3.2.1. Enzimas.

En general, las enzimas que secretan los fitopatógenos --

desintegran los componentes estructurales de las células de su hospedero; degradan las sustancias nutritivas inertes de la célula. Las enzimas son grandes moléculas protéicas que catalizan las reacciones interrelacionadas de una célula viva (1).

La mayoría de los fitopatógenos secretan enzimas durante toda su existencia o al entrar en contacto con un substrato. Si dicho substrato es una planta hospedera, la superficie de ésta puede estar constituida fundamentalmente de celulosa y -- una cutícula en las partes aéreas. Las paredes de las células epidérmicas suelen contener también proteínas y lignina. La penetración de los patógenos en los tejidos parenquimáticos y la desintegración de éstos se efectúa mediante la degradación de sus partes celulares (que constan de celulosa, pectinas y hemicelulosa) y de la lámina media, constituidas en su mayor parte por pectinas (1).

La desintegración total de los tejidos de una planta incluye, además, la degradación de la lignina de las paredes celulares. La degradación de cada una de las sustancias antes mencionadas se realiza mediante la acción de uno o varios conjuntos de enzimas que secreta el patógeno, tales como pectinasas, cutinasas, celulasas, ligninasas, etc. (1).

3.2.2. Toxinas.

La toxina es un producto químico del patógeno que produce todos o parte de los síntomas de la enfermedad de la planta. - Durbin, citado por Green (11) afirma que la toxina es un pro--

ducto microbiano, una que otra enzima que causan daños obvios al tejido de la planta. Muchos productos microbianos en medios de cultivo no son toxinas aunque ellos sean tóxicos a los tejidos de la planta.

Agrios (1) define a las toxinas como aquellas que producen una alteración en cualquiera de las reacciones metabólicas de las células vegetales, produciendo una desorganización de los procesos fisiológicos que mantienen a la planta, y por consiguiente, propiciar el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, el papel que desempeñan las toxinas en la patogénesis no es aún bien conocido, aún cuando la producción de sustancias tóxicas han sido detectadas tanto en medios de cultivo como en plantas hospederas (6).

Las toxinas se pueden clasificar en dos grupos: toxinas hospederos-específico y toxinas hospedero-no específico (1,25).

Varios autores citados por Green (11) afirman que la toxina hospedero-específica es definida como un producto metabólico de un microorganismo patógeno que es tóxico solamente al hospedero de ese patógeno. La toxina hospedero-específica produce todos los síntomas de la enfermedad causada por el patógeno.

Como ejemplo de las toxinas anteriores se tiene a: la victorina, la cual es producida por el hongo Helminthosporium y su toxicidad se limita a las plantas de la variedad Victoria de avena (Avena sativa var. Victoria); y la toxina circinata de periconia la cual es producida por el hongo Periconia circinata y ataca a las plantas de sorgo (1,25).

La toxina hospedero-no específico es aquella que afecta no sólo al hospedero de su patógeno, sino a otras plantas no hospederas o que por lo común no son atacadas por el patógeno en la naturaleza. (1). Como ejemplos de este tipo de toxinas se pueden mencionar la Piricularina, la cual es producida por el hongo Pyricularia oryzae y afecta a varias especies de plantas superiores; otro ejemplo son las toxinas de Fusarium spp. (licomarasmina y ácido fusárico) las cuales afectan directamente la permeabilidad de las membranas celulares y las reacciones enzimáticas de las células mediante la inhibición de sus enzimas en varias especies de plantas (1,25).

Anteriormente se desarrollaron trabajos de investigación en los cuales se emplearon las toxinas producidas por patógenos en medio de cultivo y así evaluar distintas especies vegetales a nivel de laboratorio (11, 10, 13, 18, 22).

3.2.3. Enzimas y toxinas producidas por M. phaseolina.

Enzimas.- El hongo produce muchas enzimas pécticas cuando se desarrollan en un substrato péctico. Estas enzimas también se han encontrado en gran actividad en extractos de plantas infectadas. La habilidad de una cepa para producir tales enzimas en medio de cultivo ó en plantas inoculadas está directamente correlacionadas con la virulencia del cultivo. La función desempeñada por las enzimas pécticas parece resumirse únicamente a la colonización del tejido, y no en la completa producción de síntomas. M. phaseolina produce una cantidad de enzimas pecto-

líticas como exo y endo-poligalacturonasa (EXO-PG y ENDO-PG) -- tanto en medios de cultivo, como en tejidos infectados (6).

Chan y Sackton citados por Dhingra y Sinclair (6) detectaron la actividad de la EXO-PG 12 horas después de inocular heridas de plantas, sin embargo, en plantas no inoculadas, la EXO-PG fué detectada 42 horas después. La actividad de la enzima no fue detectada en plantas inoculadas con aislamientos no virulentos. La ENDO-PG también fue producida en medios de cultivo y en tejido de plantas hospederas, pero la cantidad de las enzimas producidas estuvo correlacionada con la virulencia de los aislamientos. La ENDO-PG es muy efectiva en la hidrolización de constituyentes pécticos de la lámina media, y por lo tanto, es considerada importante en etapas iniciales de la patogénesis.

Toxinas.- El papel de las toxinas de M. phaseolina en el desarrollo de enfermedades aún no está bien entendido (6). Mathur, citado por Dhingra y Sinclair (6), mostró que al exponer brotes de girasol al filtrado esterilizado y no esterilizado -- del medio donde se desarrolló M. phaseolina se producían los -- síntomas foliares típicos de la enfermedad. Además, los síntomas en brotes expuestos al filtrado no esterilizado aparecieron más pronto y fueron más parecidos a los ocasionados por la enfermedad en la naturaleza que los causados en brotes expuestos al filtrado esterilizado. Rai y Singh, también citados por -- Dhingra (6), encontraron que la sustancia tóxica producida por M. phaseolina en medio de cultivo causó necrosis, clorosis y --

marchitamiento en hojas de Brassica juncea, y así mismo, también inhibió la germinación de la semilla.

De acuerdo a los resultados de investigaciones realizadas por varios autores y citados por Dhingra (6), se puede resumir que: a) el principio tóxico producido por M. phaseolina no es enzimático por que es termoestable a 121°C durante 15 minutos y puede ser dialisado a través de celofan, b) el principio tóxico es traslocado a través del sistema vascular y éste no es metabolizado por los tejidos de la planta hospedera, c) el principio tóxico no es específico para cada hospedero y no está relacionado con la virulencia de las cepas, y d) la virulencia de M. phaseolina está relacionada con la capacidad del hongo de producir toxinas.

Se han llevado a cabo diversos trabajos de investigación básica utilizando el filtrado o metabolito tóxico de Macrophomina phaseolina producido en medio de cultivo líquido para evaluar o seleccionar material germoplásmico de algunas variedades de frijol contra la enfermedad provocada por el hongo antes mencionado. Hernández (13) evaluó siete variedades de frijol in vitro de acuerdo a los daños cuantitativos (inhibición radical en cms) y cualitativos (lesiones hundidas) ocasionadas por la patotoxina de Macrophomina phaseolina. Anteriormente, Green (11) realizó un trabajo similar al de Hernández, sólo que ambos se diferenciaron en la metodología empleada para obtener la patotoxina del hongo.

3.3. Cultivo de tejidos vegetales

3.3.1. Generalidades.

En los últimos años, el desarrollo de la técnica de propagación in vitro de tejidos vegetales ha tenido un gran impulso en los países desarrollados, debido a que la producción en volúmenes altos de material libre de virus, de mayor vigor y homogeneidad genética, ha permitido no sólo incrementar la productividad de numerosos cultivos hortícolas, sino también la calidad de muchas flores de ornato de gran valor estético y comercial. Los enormes beneficios derivados del uso de esta técnica han fomentado el entusiasmo por estudiar su potencial, sobre todo en países en vías de desarrollo como el nuestro, donde es prioritaria la producción de alimento.

De acuerdo a Street, citado por Hurtado y Merino (15) se puede definir al cultivo de tejidos vegetales como aquella técnica que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica cualquier parte de una planta, bajo condiciones artificiales controladas de luminosidad, humedad y temperatura. Schaeffer (23) considera al cultivo de tejidos vegetales como una forma de crecimiento y mantenimiento in vitro de células, tejidos, o toda una planta. El término de propagación in vitro lo define como propagación de plantas en un ambiente artificial y controlado, usando recipientes plásticos o de vidrio, técnicas asépticas y un medio de crecimiento determinado. Schaeffer utiliza el término micropropagación como si

nónimo de propagación in vitro.

Murashige (19) considera que hay cuatro áreas en las cuales la aplicación de la técnica del cultivo de tejidos es posible en la actualidad o en un futuro cercano: 1) Producción de fármacos y otros productos naturales, 2) El mejoramiento genético de los cultivos, 3) El rescate de clones libres de enfermedades y la preservación de germoplasma valioso, y 4) La rápida multiplicación clonal de variedades seleccionadas.

El índice de regeneración de plantas a través del cultivo de tejidos varía grandemente de una especie a otra. Células, tejidos y órganos de numerosas especies vegetales pueden ser cultivadas sucesivamente para regenerar una planta completa. Tal vez hay distintos procesos para lograr la regeneración vegetal para cada especie, pero usualmente un proceso es más eficiente que otro. La regeneración vegetal a través del cultivo de tejidos puede ser realizada utilizando cualquiera de los siguientes métodos: cultivo de embriones, embriogénesis somática y organogénesis. El cultivo de embriones consiste en el cultivo aséptico de un embrión cigótico; el embrión es extraído de cada semilla u óvulo y sembrado en un ambiente conteniendo un endospermo sustituto (por ejemplo: medio nutritivo), el desarrollo y germinación del embrión ocurre como si estuviera en la semilla. La embriogénesis somática o asexual consiste en la producción de embriones a partir de células somáticas; el embrión somático es una estructura bipolar independiente y no es físicamente dependiente del tejido de origen. La tercera -

forma, la organogénesis, es la formación y crecimiento de vástagos a partir de callos, o la iniciación y crecimiento de brotes axilares generados del cultivo de brotes apicales y su subsecuente enraizamiento adventicio (26).

Murashige (19) reconoció que la propagación de una planta a través del cultivo de tejidos puede proceder mediante una secuencia de pasos, aunque esta secuencia no podría ser aplicada para todos los casos, ya que hay plantas que necesitarán requerimientos específicos. En un procedimiento comercial, la secuencia de pasos puede ser establecida a través de las siguientes etapas:

Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico. Aquí el objetivo es simplemente obtener un cultivo aséptico de la planta en cuestión. El cultivo puede resultar en un alargamiento de brotes apicales, enraizamiento o producción de callo, etc.

Etapa II: Multiplicación de los propágulos. El incremento puede ser logrado en muchos casos induciendo órganos adventicios, formación de embriones o aumentando la inducción de brotes axilares. En muchas especies, el método más adecuado de multiplicación sería la organogénesis adventicia de brotes o de embriones asexuales. En muchos casos, la formación de callo es empleada como una forma de multiplicación de propágulos.

Etapa III: Enraizamiento in vitro. Esta etapa está programada para preparar los propágulos para su establecimiento al transferirlos al suelo. Aquí se involucra el enraizamiento de los brotes cortados.

Etapa IV: Re-establecimiento de las plantas en el suelo.

Para que las plántulas regeneradas in vitro tengan un mayor porcentaje de sobrevivencia, es necesario incluir la fase de aclimatación para impartir algunas tolerancia a la falta de humedad, confiriendo un grado de resistencia a ciertos patógenos y la -- conversión de las plantas del estado heterotrófico al estado autotrófico.

3.3.2. Explantes y desinfestación.

El término explante es usado para describir la porción inicial de una planta introducida en un cultivo in vitro. La selección del explante juega una parte principal en los estudios sucesivos de la regeneración vegetal. El explante debe ser obtenido de plantas sanas y vigorosas. Un explante puede ser un meristemo, un brote apical, brotes axilares, hojas maduras, pecíolos, etc. Murashige (19) recomienda que para la elección de un explante adecuado, la investigación debe considerar: a) el órgano que servirá como fuente de tejido, b) el estado fisiológico u ontogénico del órgano, c) la estación del año en la cual el explante será obtenido, d) el tamaño del explante, y, e) las características totales de la planta de la cual los explantes -- van a ser obtenidos.

Después de la selección del explante, la desinfestación es un procedimiento de primaria consideración. Esta desinfestación es necesaria para erradicar los microorganismos superficiales, y para ello se recomienda lavar los explantes en agua jabo

nosa o etanol (baño rápido) para lograr un remojo y limpieza inicial. Comúnmente se utiliza una solución de hipoclorito de sodio diluido (0.25-2.63%) como desinfectante. Un emulsificante como el Tween-20 es añadido a razón de una gota por cada 100 ml. de solución de hipoclorito de sodio. Los explantes vegetativos usualmente son esterilizados de 10 a 20 minutos y deben ser enjuagados con agua destilada estéril para remover los residuos del desinfectante (26).

Según Huertado y Merino (15) un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales no es muy distinto de cualquier otro laboratorio de investigación; la diferencia principal estriba en las condiciones de asepsia que se requieren para el establecimiento de cultivos asépticos, entendiéndose como asepsia el conjunto de métodos destinados a preservar de gérmenes infecciosos al organismo (a los cultivos in vitro, en éste caso). Para lograr un buen control aséptico en un laboratorio de este tipo el trabajo debe realizarse en diferentes áreas o salas separadas.

3.3.3. Medios de cultivo.

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, así como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. Al utilizar las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos pa

ra casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales (15).

Una gran cantidad de medios para el cultivo de tejidos -- son apropiados para la regeneración vegetal. La formulación -- desarrollada por Murashige y Skoog en 1962 es el medio más empleado en el campo del cultivo de tejidos vegetales (20,26).

La composición química de un medio de cultivo puede ser -- simplificada substancialmente considerando los constituyentes -- en estas tres categorías: mezclas de sales inorgánicas, substancias orgánicas y compuestos naturales (19).

Afortunadamente, a pesar de la gran variabilidad en el genotipo de las plantas, el explante y el propósito por el cual -- el cultivo de tejidos se ha programado, los requerimientos de sales inorgánicas (MS) se han extendido a casi todas las especies.

Los requerimientos de carbohidratos han sido satisfechos -- muy fácilmente, generalmente con la adición de sacarosa a una concentración de 2 a 3%. La glucosa ha sido superior a la sucrosa sólo ocasionalmente. Otros carbohidratos se han usado, -- pero ninguno ha demostrado superioridad sobre la sacarosa o -- glucosa. Las vitaminas incluidas comúnmente son la Thiamina, -- inositol, ácido nicotínico y piridoxina. La Thiamina es crítica y generalmente es suministrada en rango de 0.1 a 0.4 mg L⁻¹. El inositol no es esencial, sin embargo, se han obtenido muy -- buenos resultados utilizandose a una concentración de 100 mg L⁻¹ (19).

Los componentes orgánicos más críticos de los medios de propagación de plantas son los reguladores de crecimiento: las auxinas y las citocininas. La auxina más empleada es el ácido indolacético (AIA) y presenta una mínima oposición sobre la formación de órganos pero es quizás la auxina más débil y es inactivada fácilmente en algunos cultivos de tejidos. En contraste, la auxina 2,4-D es la más potente y mientras que estimula el cultivo de callo, antagoniza fuertemente el desarrollo organizado. De las tres citocininas (BA, Cinetina y 2iP), la 2iP es la más activa de las tres, pero es la más costosa. La cinetina y la BA (Bencil Adenina) son casi iguales en efectividad (19).

Skoog y Miller, citados por Murashige, descubrieron que la inducción de brotes y raíces está regulada básicamente por interacciones entre dos reguladores de crecimiento: auxinas y citocininas (19). Generalmente, un medio con altos niveles de auxina induce la formación de callos, especialmente cuando se utiliza una auxina fuerte como el 2,4-D. La inclusión de citocininas con auxinas es útil para la formación de callos en algunas especies. Comúnmente para lograr la inducción y formación de brotes a partir de callo (organogénesis) se disminuye la concentración de auxinas en el medio (26). Una concentración relativamente alta de auxina, favorece la inducción de raíz, mientras que reprime la formación de brotes. En contraste, las concentraciones relativamente altas de citocininas inducen la formación de brotes y suprimen el enraizamiento (19).

De acuerdo a las necesidades de la planta que se desee micropropagar o a la naturaleza de la investigación que se realice, se utilizan medios líquidos, sólidos o semisólidos. Para gelificar un medio se utiliza comúnmente agar u otros agentes-gelificantes como la policrilamina y la silicagel (15). Algunas veces es necesario incluir antioxidantes para retardar el obscurecimiento y deterioración de los tejidos extraídos recientemente, o antibióticos para suprimir el desarrollo microbiano (19).

3.3.4. Ambiente requerido.

Los cultivos de tejidos vegetales se desarrollan diferentemente dependiendo en el tipo de ambiente al que son sometidos. Muchos factores juegan un papel importante en la morfogénesis del cultivo, y estos factores son: la composición física del medio, la intensidad, tipo y duración de la luz, la temperatura, la relación oxígeno/dióxido de carbono y la concentración de otros gases. Los explantes son frecuentemente establecidos bajo condiciones de intensidad lumínica que van de 500 a 1000 lux, usando un fotoperíodo de 16 horas luz. La luz es usualmente suministrada por lámparas fluorescentes o lámparas-especiales para el crecimiento vegetal (Gro-Lux). Más tarde, las plantas provenientes del cultivo de tejidos ya desarrolladas, son trasladadas a altas intensidades lumfnicas de 5000 a 10000 lux para promover el desarrollo fotosintético y ayudar en la adaptación requerida para el establecimiento de la planta en un ambiente in vivo. La temperatura del cuarto de cultiti

vo es usualmente mantenida alrededor de los 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Algunas especies tal vez requieren tratamiento con variación de -- temperatura para un óptimo crecimiento (26).

Así, se puede resumir que los factores principales del am biente en el cultivo de tejidos son la luz y la temperatura. La información con respecto a la humedad relativa del local o recipiente de cultivo es por demás una parte sin importancia, ya que la humedad relativa del microambiente dentro de un cultivo es generalmente alrededor del 100% (19).

3.3.5. Cultivo de callos.

Un tejido organizado, como el de una raíz o un tallo, puede ser completamente cambiado a una rápida proliferación de ma sa de células indiferenciadas (callos), si es cultivado en un medio nutritivo conteniendo hormonas específicas de crecimiento como AIA, ANA, AIB, 2,4-D, etc. (21). El callo se puede de finir como un tejido obtenido por medio del aislamiento de ór ganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son - llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas cé lulas una proliferación continua acelerada y de apariencia des organizada, que da origen a una masa amorfa de tejido formado por células de parénquima (2,15).

Desde el punto de vista morfogénico, la característica -- más importante del callo es la totipotencialidad de sus célu -- las, ya que, en general, con un manejo adecuado de las condi -- ciones nutricionales, hormonales y ambientales, este tiene la

capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plántulas completas. Sin embargo, un serio problema asociado con este tejido es el daño o modificación de la citología nuclear de las células durante el cultivo. Se pueden presentar aberraciones cromosómicas, mutaciones puntuales y diferentes tipos de ploidías, así como irregularidades cariocinéticas, que se manifestarán por sus consecuencias implícitas (15).

El cultivo de callos puede ser derivado de una amplia variedad de órganos vegetales, tales como raíces, hojas, embriones, polen, etc. En general, los callos derivados de embriones y plántulas (tejidos jóvenes) tienen mayor potencial para la morfogénesis, siendo importante el estado fisiológico y la edad de la planta donadora del explante, recomendándose utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo (8,15). Es recomendable utilizar explantes que contengan un gran número de células (de 5.0 a 10.0 mm de tamaño) (2,15).

La desinfección del explante se puede realizar con una solución de hipoclorito de sodio o de calcio al 10-14% w/v durante un tiempo de 10 a 40 minutos, dependiendo de que el explante provenga, ya sea de una planta desarrollada en un ambiente aséptico, o bien, de un cultivo a la intemperie (2,8,21).

En general, las auxinas y los reguladores de crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo de callo son el ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftalen acético

(ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en concentraciones que generalmente oscilan de 0.1 a 10.0 mg L⁻¹ encontrándose, para cada especie, una auxina o un regulador del crecimiento y una concentración óptima para la inducción y mantenimiento del callo (15).

Gutiérrez, Miranda y Gaona (12) reportan que obtuvieron formación de callos de tres genotipos de frijol a los siete días de sembrados los explantes obtenidos de hipocotilos de plántulas de 26 días de edad, y sembrados en un medio MS adicionado con 2,4-D (0.5 mg L⁻¹), cinetina (0.3 mg L⁻¹) y AIA (5.0 mg L⁻¹) con un pH de 6.6. Este medio mostró ser muy adecuado para la inducción y mantenimiento de callos de frijol, por lo que se optó utilizarlo durante el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Por lo general, el callo toma de tres a ocho semanas para alcanzar el tamaño suficiente para efectuar un subcultivo, transfiriéndose este en pequeñas piezas de tejidos (50 a 150 mg) a medio nuevo. Cuando el cultivo de callo está establecido, se recomienda cambiarlo a medio nuevo con una frecuencia que varía de dos a seis semanas, ya que la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido. Los callos subcultivados (callos viejos) muchas veces pierden a través del tiempo su capacidad morfogénica; posiblemente esta pérdida es causada por el incremento de anomalías cromosómicas, por lo que debe ser frecuente la renovación del material biológico del que se obtenga el callo (15).

El cultivo del callo se puede dividir en las etapas siguientes (15):

- a) Inducción. En esta etapa las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular. Durante esta fase el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- c) Inducción de la diferenciación. En esta fase se obtienen meristemas, tanto apicales como radiculares, embriones, tejido vascular, etc., a partir de la masa celular del callo.
- d) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

Específicamente, se han realizado algunos trabajos con callos de frijol, tales como los de M.C. Mok et al. (16,17). Davidonis et al. (4) realizó experimentos con callos de soya. Holliday y Klarmán (14) evaluaron la expresión del tipo de reacción de la enfermedad ocasionada por Phytophthora megasperma en callos de plantas susceptibles y resistentes de soya.

Gray, L.F. et al. (10) obtuvo callos de soya provenientes de plantas susceptibles y resistentes y los expuso al filtrado tóxico del hongo Phialophora gregata. Los callos fueron expuestos al filtrado tóxico de aislamientos patogénicos y no patogénicos del hongo. El grado de necrosis, crecimiento y viabilidad de los callos fué determinado después de varios periodos de tiempo de exposición al filtrado tóxico del hongo.

IV. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. El financiamiento estuvo a cargo del Centro de Investigaciones-Agropecuarias (CIA) de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

4.1. Materiales

Se utilizó material de uso rutinario de laboratorio (probetas, vasos de precipitado, etc.).

Cepas aisladas del hongo Macrophomina phaseolina (Tassi) - Goid proporcionadas por el Proyecto de Pudrición Texana de la F.A.U.A.N.L.

Reactivos para la preparación de los medios MS descritos por Murashige y Skoog (20).

Hormonas y vitaminas, las cuales complementaron el medio MS, preparándose así el medio R3 (12):

- Acido indolacético (AIA).
- Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D).
- Cinetina.
- Thiamina.
- Piridioxina.
- Acido nicotínico.

Material germoplásmico: semilla de frijol:

- Línea LEF-1-RB.
- Variedad Agrarista.

Equipo especial: campana de flujo laminar, cuarto de incubación; con temperaturas de 25°C fotoperíodo de 16/8 y 3000 -- lux de luminosidad.

4.2. Métodos

El experimento también tuvo como objetivo evaluar los callos de los dos genotipos de frijol en medios de cultivo líquido y sólido R3 con las diferentes concentraciones del metabolito tóxico.

4.2.1. Multiplicación de M. phaseolina en medio líquido (PD).

El medio líquido PD (papa-dextrosa) para la multiplicación del hongo Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid se preparó con 250 gr de papa por litro de agua destilada, más 10 gr de dextrosa y 100 mg de estreptomina. La papa en trozos se hirvió en 500 ml de agua hasta su cocimiento. El extracto obtenido y decantado se aforó a un litro con agua destilada. Posteriormente se agregaron 10 gr de dextrosa y se disolvió completamente. A este medio se le agregó 100 mg de estreptomina como antibiótico. El litro de medio se repartió en 2 frascos de a un litro (500 ml x frasco) y se procedió a esterilizarlos a 1 kg/cm² de presión y 121°C durante 15 minutos.

Una vez esterilizado el medio y ya frío, se sembraron en los frascos con medio PD trozos de aproximadamente 1 cm de diámetro de la cepa del hongo. Esta operación se realizó bajo condiciones de completa esterilidad para evitar contaminación.

Después de sembrado el hongo, los frascos se colocaron en un -- agitador mecánico, en donde permanecieron en agitación constante por espacio de 10 días a 60 RPM. Al término de este tiempo, los frascos conteniendo el medio y el hongo se pasaron a la incubadora, donde permanecieron 10 días a temperatura de 29-30°C.

4.2.2. Obtención del metabolito tóxico del patógeno.

Todo el material que se utilizó en esta operación se esterilizó adecuadamente para evitar contaminación durante la extracción del metabolito tóxico. A un matraz de Kitasato se le conectó una bomba de vacío y a su vez se le colocó un embudo de Buchner con papel filtro Wathman del No. 30. En el embudo con papel filtro se vació el medio líquido que contenía al hongo ya multiplicado, y por acción del vacío se filtró solamente el medio líquido conteniendo el metabolito tóxico del hongo, quedando el micelio en el papel filtro. La filtración se realizó dos veces para asegurar que no quedaran porciones de micelio que -- posteriormente pudieran desarrollarse y ocasionar contaminación al combinar el metabolito tóxico con los medios de cultivo para callos de frijol. Una vez obtenido el metabolito tóxico, se -- pasterizó a 60°C durante 30 minutos a baño maría, con la finalidad de eliminar alguna contaminación que se pudiera haber presentado al efectuar la extracción y filtración. Bajo estas condiciones se consideró que el metabolito tóxico obtenido se encontraba a una concentración del 100%.

4.2.3. Inducción y mantenimiento de callos de frijol.

Preparación de medio R3 para inducción y mantenimiento de callos de frijol. El medio R3 consistió en los nutrientes minerales descritos por Murashige y Skoog (20), más las siguientes sustancias orgánicas: sacarosa (30 gr L^{-1}) myo-inositol -- (100 mg L^{-1}) thiamina (0.1 mg L^{-1}), piridoxina (0.5 mg L^{-1}), - ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), cinetina (0.3 mg L^{-1}), 2,4-D -- (0.5 mg L^{-1}) y ácido indolacético (5.0 mg L^{-1}). Para solidificar el medio se agregaron 2 gr L^{-1} de gel "Gelrite". El pH -- del medio fue ajustado a 5.7. El medio fue distribuido en --- frascos gerber a razón de 25 ml por frasco; se taparon cada -- uno de los frascos con tapas herméticas de plástico y se procedió a la esterilización durante 15 minutos a 1 kg/cm^2 de pre-- sión y temperatura de 121°C . Para preparar el medio líquido - se realizó todo lo anterior, sólo que no se le agregó el "Gel-rite".

Obtención del explante. El explante se obtuvo a partir - de hipocotilos de plántula de frijol y la metodología empleada fue la siguiente: se desinfectó semilla de los dos genotipos - en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) más 20 gotas de tween 20 como agente humectante por litro de solución - desinfectante durante 10 minutos. Después se lavó la semilla - tres veces con agua destilada estéril para eliminar residuos - de cloro que hubieran podido inhibir la germinación. Poste-- riormente la semilla se sembró en frascos gerber con agar al - 0.6% previamente preparados y esterilizados. Todo lo anterior

se realizó en la campana de flujo laminar para evitar contaminación. El material se incubó a 25°C con fotoperíodo de 16/8 (horas luz/oscuridad).

A los 5-7 días de emergidas las plántulas, los hipocotilos se obtuvieron cortando 1 cm arriba del cuello de la raicilla y 1 cm abajo de las hojas cotiledonares. Después los hipocotilos se seccionaron en pequeños cortes cilíndricos de aproximadamente 5 mm, los cuales constituyeron el explante. Los explantes se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) más tween 20 durante 5 minutos, y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril e inmediatamente después se sembraron en el medio sólido R3 para inducir la formación de callos. Cada paso se realizó en la campana de flujo laminar. La incubación fue a 25°C con fotoperíodo de 16/8 (horas luz/oscuridad) a 3000 lux de intensidad lumínica.

Aproximadamente a los 7 días comenzaron a formarse los callos en los explantes, y a los 20 días de siembra se realizó un subcultivo, ya que el callo había adquirido un tamaño aproximado de 2.5 cm de diámetro. El subcultivo tuvo el propósito de multiplicar el callo, así como de transferirlo a medio fresco. Igualmente, toda esta operación se realizó en la campana de flujo laminar.

4.2.4. Aplicación del metabolito tóxico del hongo a los callos de frijol.

El metabolito tóxico se agregó a los medios R3, de tal forma que este estuviera presente en concentraciones de 25% y 50%.

Estas concentraciones se eligieron considerando resultados obtenidos por González (9) en los cuales encontró que al exponer -- plántulas de frijol al metabolito tóxico de Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid éstas presentaron daños a concentraciones entre 25 y 50%, en donde dicho metabolito tóxico se obtuvo de la misma cepa del hongo utilizada en este trabajo de tesis. Así, se creyó conveniente utilizar dosis bajas (25%) y una dosis alta (50%), con su respectivo testigo (dosis 0%), para evaluar el comportamiento de los callos de frijol en presencia del metabolito tóxico del hongo.

El metabolito tóxico se agregó a los medios inmediatamente después de esterilizarlos, ya que el agregarlo antes podría ocasionar una posible degradación a causa de la esterilización. Esta actividad se realizó también en la campana de flujo laminar, al igual que la siembra de los callos en los medios conteniendo las dosis del metabolito tóxico. En los medios sólidos se sembraron trozos de callo de aproximadamente 1 cm de diámetro y se dejaron incubando a 25°C con fotoperíodo 16/8 y 3000 lux de intensidad lumínica durante 21 días para evaluar su comportamiento.

La metodología para evaluar los callos en medio líquido -- fue la siguiente: se colocaron los trozos de callo de los dos -- genotipos en los medios líquidos conteniendo la toxina a las -- dos concentraciones y su testigo, usándose para ello matraces -- Erlenmeyer estériles de 250 ml como recipientes contenedores -- del medio y el callo. Los matraces se mantuvieron en agitación constante en un agitador mecánico y se incubaron bajo las mis--

mas condiciones antes mencionadas para los medios sólidos. De safortunadamente a los 2 días se observó gran contaminación, - por lo que se tuvo que eliminar esta parte del experimento.

Así, finalmente se evaluó el comportamiento de los callos de los 2 genotipos de frijol en medio sólido conteniendo el metabolito tóxico de M. paseolina (Tassi) Goid en las concentraciones de 0%, 25% y 50%.

4.2.5. Diseño estadístico.

Para tal efecto, se consideró un diseño completamente al-azar en arreglo factorial. Los factores y los niveles de cada factor fueron:

Factor A: Genotipos de Frijol	1 variedad agrarista
	2 línea LEF-1-RB
	1 (0%)
Factor B: Concentración en el medio del metaboli <u>to</u> tóxico.	2 (25%)
	3 (50%)

Se obtuvieron 6 tratamientos, cada uno con 7 repeticiones para un total de 42 observaciones.

T1 = Agrarista, (0%)	T4 = LEF-1-RB, (0%)
T2 = Agrarista, (25%)	T5 = LEF-1-RB, (25%)
T3 = Agrarista, (50%)	T6 = LEF-1-RB, (50%)

El modelo estadístico fué el siguiente:

$$Y_{ijk} = M + V_i + T_j + VT_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = efecto obtenido de la ijk -ésima observación.

M = media general del experimento.

V_i = efecto del i -ésimo genotipo.

T_j = efecto de la j -ésima concentración de metabolito tóxico.

VT_{ij} = efecto de la ij -ésima interacción genotipo-concentración de metabolito tóxico.

E_{ijk} = error experimental.

$i = 1, \dots, v = 2$

$j = 1, \dots, t = 3$

$k = 1, \dots, r = 7$

$vtr = 42$ obs.

4.2.6. Evaluación de resultados.

Las variables que se consideraron fueron: incremento en peso fresco a los 21 días y grado de necrosis a los 7, 14 y 21 -- días de expuestos los callos al metabolito tóxico.

Incremento en peso fresco: debido a que el callo no se pudo pesar directamente por tratar de evitar la contaminación del mismo, el peso inicial del callo se tomó en forma indirecta, es decir, primero se pesó el frasco gerber con tapa y medio, y después de sembrado el callo se volvió a pesar el frasco con tapa, medio y callo, obteniendo por diferencia el peso inicial. El peso final si se pudo obtener directamente, puesto que el callo ya no se utilizó. Por diferencia se obtuvo el incremento en peso a los 21 días.

Grado de necrosis: esta variable cualitativa se midió considerando la coloración que presentó el callo a los 21 días de expuesto al metabolito tóxico de Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. Para lo anterior se designó una escala arbitraria:

- 0 Sin pigmentación (0% de tejido pigmentado)
- 1 Amarillo tenue (25% de tejido pigmentado)
- 2 Amarillo intenso (50% de tejido pigmentado)
- 3 Café pardo (75% de tejido pigmentado)
- 4 Necrótico (100% de tejido pigmentado)

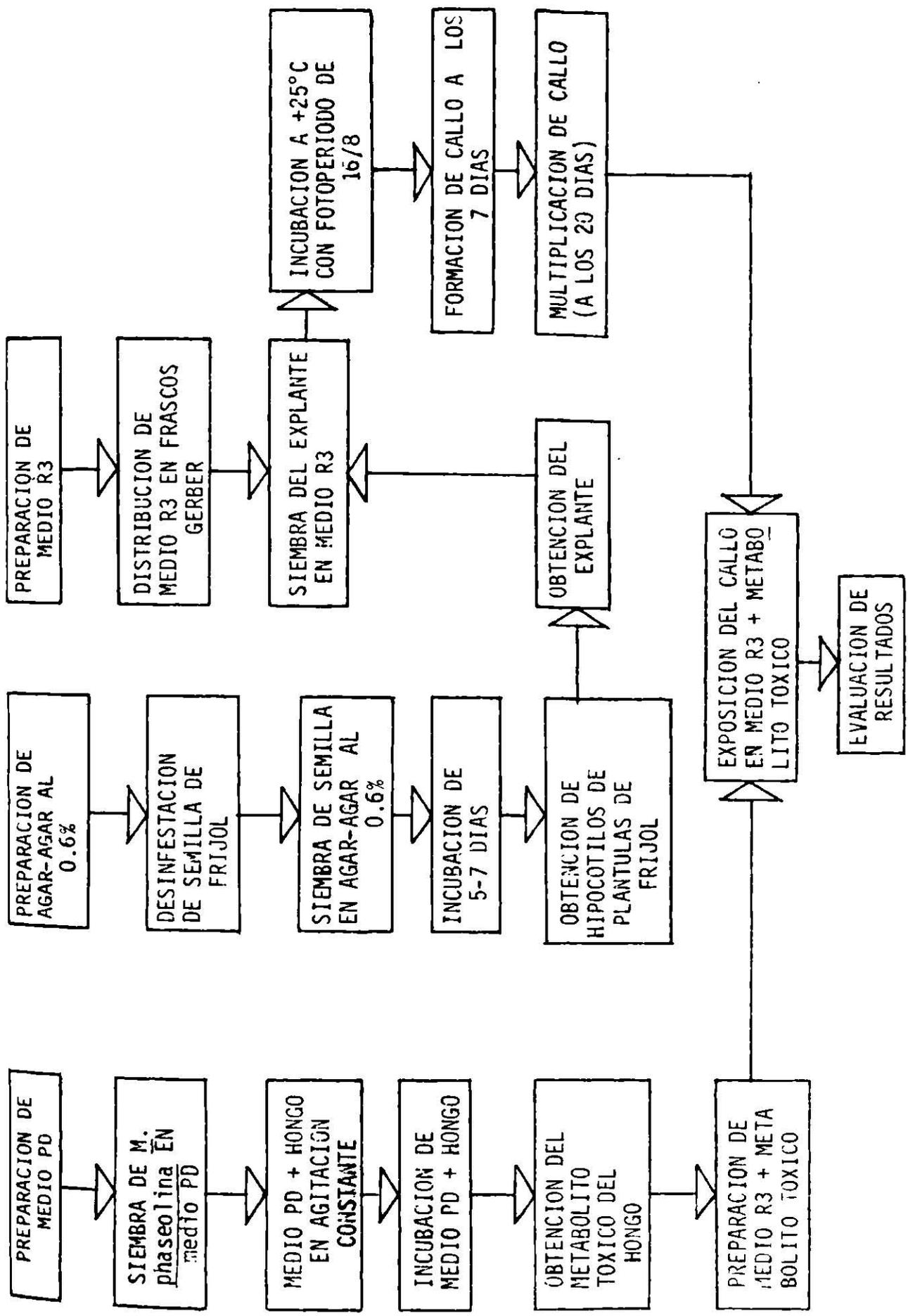


Figura 1. Diagrama de flujo mostrando la secuencia seguida durante el desarrollo del experimento.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Resultados

Para evaluar los callos de los dos genotipos de frijol en las diferentes concentraciones del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina se trató de utilizar dos medios, uno sólido y otro líquido. Sin embargo, no fue posible evaluar los callos en el medio líquido debido a que hubo mucha contaminación originada por la falta del perfeccionamiento de la técnica del cultivo en medio líquido y a la gran manipulación que se realizó al preparar los medios con metabolito tóxico. Por lo tanto, la comparación de tratamientos se hizo únicamente con medio sólido.

Los resultados de las variables incremento en peso fresco y grado de necrosis se analizaron estadísticamente por separado y se realizaron las comparaciones de medias correspondientes.

5.1.1. Incremento en peso fresco.

El incremento en peso fresco de los callos se obtuvo a los 21 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo. Se realizó el análisis de varianza (Tabla 1) bajo el diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial con 7 repeticiones.

En la Tabla 1 se puede apreciar que existió una diferencia altamente significativa entre los niveles del factor A (genotipos de frijol), entre los niveles del factor B (concentra-

ciones de metabolito tóxico] y en la interacción AxB, por lo -- que se realizaron las comparaciones de medias de genotipos dentro de cada concentración del metabolito tóxico.

Las comparaciones de medias para establecer si había diferencia o no entre los dos genotipos (factor A) con respecto al incremento en peso fresco a los 21 días en presencia de las concentraciones de 0%, 25% y 50% del metabolito tóxico (factor B) se presentan en la Tabla 2.

De acuerdo a las comparaciones de medias de la Tabla 2, la media del incremento en peso fresco fué superior en la variedad Agrarista con respecto a la línea LEF-1-RB cuando los callos -- fueron expuestos en la concentración de 0% del metabolito tóxico del hongo. Las medias del incremento en peso fresco de los callos expuestos en las concentraciones de 25% y 50% no presentaron diferencia estadística entre genotipos.

5.1.2. Grado de necrosis.

Debido a que se presentaron grados de necrosis igual a cero, los datos de esta variable a los 7, 14 y 21 días fueron --- transformados con la fórmula $\sqrt{x+1}$. El análisis de varianza para el grado de necrosis de los callos después de 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina (Tassi) -- Goid se presenta en la Tabla 3, donde se observa que hubo una diferencia altamente significativa en los genotipos y en las -- concentraciones de metabolito tóxico. La interacción presentó una diferencia estadística no significativa, por lo que única-

mente se realizaron comparaciones de medias de los efectos principales de genotipos y concentración de metabolito tóxico (Tablas 4 y 5).

La Tabla 4 muestra que las medias difirieron estadísticamente, observándose que la variedad Agrarista presentó en promedio un mayor grado de necrosis (1.817) que la línea LEF-1-RB (1.500).

En la Tabla 5 de comparación de medias se puede apreciar que en promedio hubo un mayor grado de necrosis cuando el callo de los dos genotipos fue expuesto a la concentración de 50% de metabolito tóxico. En general, se aprecia que a medida que se disminuyó la concentración del metabolito tóxico, hubo menor grado de necrosis en los callos.

Tabla 1. Análisis de varianza para la variable incremento en peso fresco en callos de dos genotipos de frijol a los 21 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P F
Genotipo	1	7.834660	7.834660	16.0567**	0.001
Toxina	2	41.904598	20.952299	42.9406**	0.000
Interacción	2	7.082005	3.541002	7.2571**	0.003
Error	36	17.565735	0.487937		
Total	41	74.386997			

C.V. = 67.20%

** Diferencia altamente significativa

Tabla 2. Comparación de medias del incremento en peso fresco de callos de dos genotipos de frijol (en gramos) a los 21 días de expuestos en tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

Genotipos de frijol	Concentración de metabolito tóxico		
	0%	25%	50%
Agrarista	3.4104 A	0.8847 A	0.1190 A
LEF-1-RB	1.4476 B	0.2448 A	0.1302 A
Nivel de Significancia = 0.05		Tukey = 0.7589	

Tabla 3. Análisis de varianza para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P F
Genotipos	1	1.053421	1.053421	37.7604**	0.000
Toxina	2	4.264328	2.132164	76.4285**	0.000
Interacción	2	0.103569	0.051785	1.8562NS	0.169
Error	36	1.004311	0.027898		
Total	41	6.425629			

C.V. = 10.07%

** Diferencia Altamente Significativa
NS No Significativo

Tabla 4. Comparación de medias de genotipos para la variable -- grado de necrosis en callos de frijol a los 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

Genotipos	Media
Agrarista	1.817 A
LEF-1-RB	1.500 B

Nivel de Significancia = 0.05 Tukey = 0.1819

En la Tabla 6 se muestra el análisis de varianza realizado para la variable grado de necrosis a los 14 días después de haber expuesto los callos de los dos genotipos de frijol al metabolito tóxico del hongo. Se encontró que hubo diferencias altamente significativas en los genotipos de frijol, la concentración de metabolito tóxico y la interacción AxB, por lo que se realizó la comparación de medias respectivas (Tabla 7).

En la comparación de medias (Tabla 7) se observó que hubo una diferencia significativa entre las medias de genotipos en las diferentes concentraciones de metabolito tóxico. Los callos de la variedad Agrarista presentaron un mayor grado de necrosis en las tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo, a diferencia de los de la línea LEF-1-RB que presentaron un menor grado de necrosis.

Tabla 5. Comparación de medias de los distintos niveles de metabolito tóxico para la variable grado de necrosis en callos de frijol a los 7 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

Toxina	Media
0%	1.236 A
25%	1.733 B
50%	2.006 C

Nivel de Significancia = 0.05

Tukey = 0.2184

Tabla 6. Análisis de varianza para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 14 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P F
Genotipos	1	1.053452	1.053452	55.6075**	0.000
Toxina	2	3.772087	1.886044	99.5567**	0.000
Interacción	2	0.187569	0.093784	4.9505**	0.012
Error	36	0.681999	0.018944		
Total	41	5.695107			

C.V. = 8.07%

** Diferencia Altamente Significativa

El análisis de varianza para la variable grado de necrosis a los 21 días en callos de los genotipos de frijol se presenta en la Tabla 8. Este análisis mostró una diferencia altamente significativa en los genotipos, concentraciones de metabolito tóxico y en la interacción de los factores. La comparación de medias de los genotipos dentro de cada nivel de metabolito tóxico se presenta en la Tabla 8.

La Tabla 9 de comparación de medias de los genotipos dentro de cada concentración de metabolito tóxico, muestra que los callos de la variedad Agrarista presentaron un mayor grado de necrosis en las concentraciones de 0 y 25% de metabolito tóxico, en comparación con los de la línea LEF-1-RB que presentaron un menor grado de necrosis. En la concentración de 50% ambos genotipos se comportaron igual estadísticamente, por lo que a los 21 días de expuestos los callos de los dos genotipos en el metabolito tóxico del hongo, sólo a las concentraciones de 0 y 25% hubo diferencia estadística, siendo la línea LEF-1-RB la que presentó un menor grado de necrosis, en comparación con la variedad Agraria que presentó un mayor grado de necrosis.

Tabla 7. Comparación de medias para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 14 días de expuestos a tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

Genotipos de frijol	Concentración de metabolito tóxico		
	0%	25%	50%
Agrarista	1.4596 A	2.0000 A	2.1349 A
LEF-1-RB	1.1775 B	1.5050 B	1.9617 B
Nivel de Significancia = 0.05		Tukey = 0.1494	

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de expuestos al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P F
Genotipos	1	1.090797	1.090797	50.0003**	0.000
Toxina	2	2.319839	1.159920	53.1687**	0.000
Interacción	2	0.251076	0.125538	5.7544**	0.007
Error	36	0.785370	0.021816		
Total	41	4.447083			

C.V. = 8.54

** Diferencia Altamente Significativa

Tabla 9. Comparación de medias para la variable grado de necrosis en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de expuestos a tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

Genotipos de frijol	Concentración de metabolito tóxico		
	0%	25%	50%
Agrarista	1.6412 A	1.9617 A	2.0674 A
LEF-1-RB	1.2367 B	1.5050 B	1.9617 A

Nivel de Significancia = 0.05

Tukey = 0.1609

5.2. Discusión

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable incremento en peso fresco de los callos de frijol a los 21 días (Tabla 1) mostraron un coeficiente de variación-relativamente alto (67.20%), debiéndose lo anterior a las causas siguientes: 1) el peso inicial de los callos de los dos genotipos de frijol expuestos al metabolito tóxico no pudo ser homogéneo en todos los tratamientos, y, 2) debido a que no fué posible pesar directamente el callo; el peso inicial se obtuvo en forma indirecta (como se explicó en materiales y métodos).

La comparación de medias (Tabla 2) para la variable incremento en peso fresco de los callos de los dos genotipos de frijol dentro de cada concentración de metabolito tóxico después de 21 días, muestra que en la concentración de 0% la variedad Agrarista obtuvo un mayor incremento en peso fresco que el obtenido por la línea LEF-1-RB. Este resultado indica que la variedad Agrarista se comportó mejor que la línea LEF-1-RB bajo las condiciones normales del medio utilizado (medio R3 sin metabolito tóxico). Cuando se comparan los callos de los dos genotipos en las diferentes concentraciones de metabolito tóxico (Tabla 2), se observa que no hay diferencia significativa. Además, también se encontró que el incremento en peso fresco de la variedad Agrarista disminuyó más que el de la línea LEF-1-RB en presencia del metabolito tóxico. Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, se deduce que la variedad Agrarista puede ser menos tolerante que la línea LEF-1-RB al metabolito tóxico del hongo M. phaseolina.

Los resultados obtenidos con el análisis de la variable incremento en peso fresco de los callos de los dos genotipos de frijol coinciden con los resultados obtenidos al analizar la variable grado de necrosis. En general, en la variedad Agrarista tuvo un grado de necrosis mayor que la línea LEF-1-RB.

En general, para las variables incremento en peso fresco y grado de necrosis, se encontró que a medida que se aumentó la concentración del metabolito tóxico en el medio R3, fué menor el incremento en peso fresco y mayor el grado de necrosis de los callos de los dos genotipos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Green (11) en el sentido de que a medida que se aumentó la concentración del metabolito tóxico fué mayor el daño que se manifestó en plántulas de frijol.

Si se observan todas las comparaciones de medias de los genotipos en cada concentración de metabolito tóxico para las variables incremento en peso fresco y grado de necrosis de los callos (Tablas 2, 7 y 9), en la concentración de 0% de metabolito tóxico se presentaron diferencias estadísticas entre genotipos, en donde dichas diferencias se debieron más que nada a las características intrínsecas de cada genotipo. El grado de necrosis se debió posiblemente también al efecto de la edad del callo (envejecimiento) y a la oxidación.

Green (11) en su estudio encontró que utilizando concentraciones bajas de metabolito tóxico del hongo M. phaseolina (12.5 y 25%) para evaluar genotipos de frijol en estado de plántula, se pueden obtener resultados que indiquen la resistencia o ----

susceptibilidad de cierto genotipo al metabolito tóxico del hongo. Si se consideran los resultados anteriores y se comparan con los de éste trabajo, en la concentración de 50% de metabolito tóxico en medio R3 se esperaba una mayor acción de la toxina sobre el callo (necrosis total), pero no sucedió así, asignándose este efecto a la baja virulencia de la cepa del hongo del cual fué extraído el metabolito tóxico, al tiempo de almacenamiento de la toxina (7 meses) y a la poca área de exposición del callo en el medio conteniendo la toxina, posiblemente debido al gran tamaño del callo, ya que no todas las células del tejido fueron afectadas de igual manera.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente experimento se concluye que:

- Cuando se aumentaron las concentraciones del metabolito tóxico del hongo Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid en el medio R3 para evaluar los callos de los dos genotipos de frijol (Línea LEF-1-RB y variedad Agrarista) fué evidente que aumentaba el daño en el callo, reflejado en menor incremento en peso -- fresco y mayor grado de necrosis.
- Los resultados obtenidos por los análisis estadísticos, se -- puede concluir que la línea LEF-1-RB fue más tolerante al --- efecto del metabolito tóxico del hongo Macrophomina phaseolina en comparación con la variedad Agrarista, que mostró tener menos tolerancia al metabolito tóxico.
- El efecto del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina con - respecto a su acción dañina en el tejido de los callos de frijol no fue tan agresivo como se esperaba, debiendose posiblemente a la baja virulencia de la cepa del hongo del cual fué extraído el metabolito tóxico, y al tiempo de almacenamiento de la toxina (7 meses).
- La evaluación de los callos de los dos genotipos de frijol al metabolito tóxico de M. phaseolina utilizando medio R3 líquido no fue posible debido al alto grado de contaminación que - se presentó en esta fase del experimento.

6.2. Recomendaciones

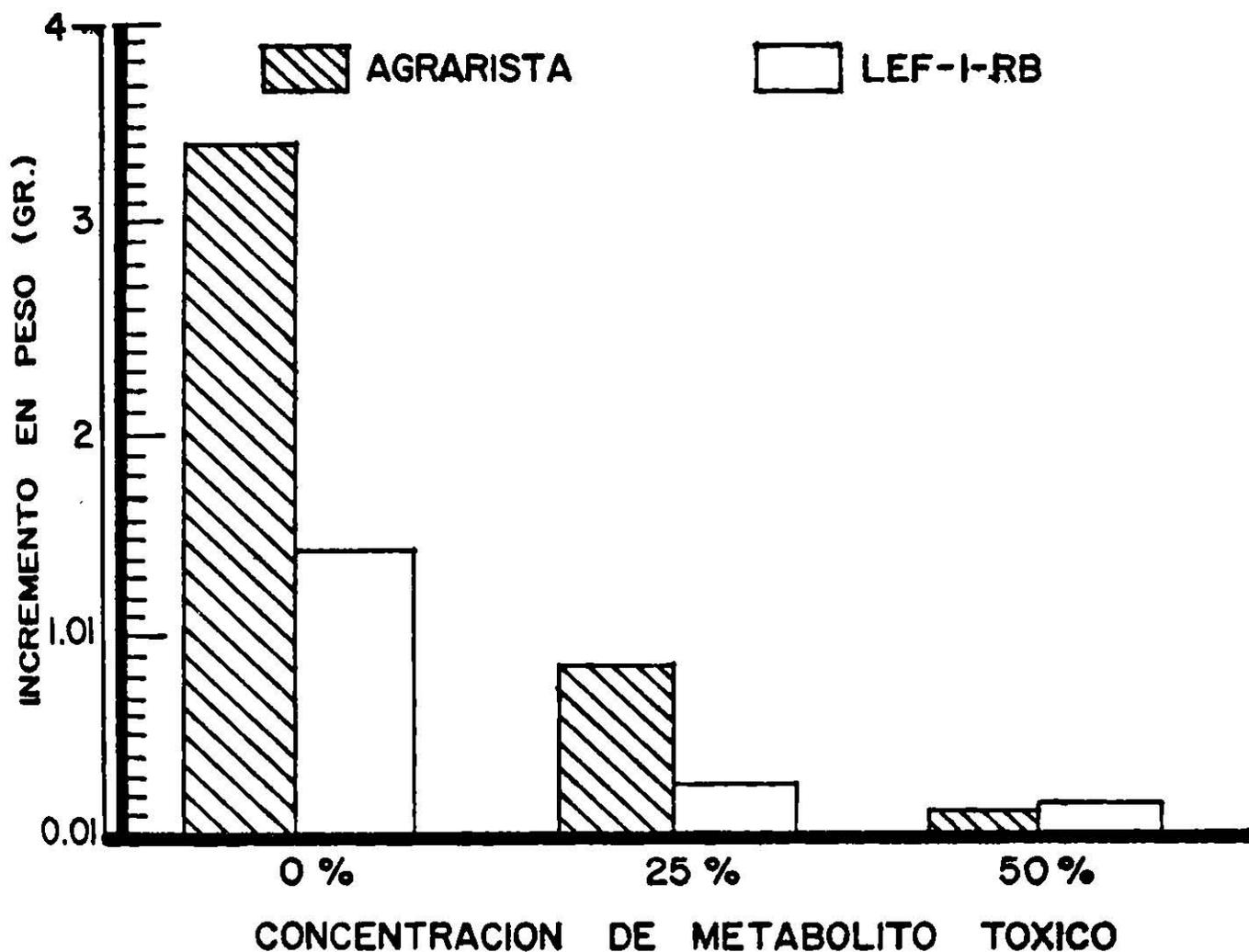
Considerando los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación, se recomienda:

- Utilizar metabolito tóxico de una cepa de hongo que se conozca tenga una alta virulencia, para así obtener resultados más notables al evaluar material germoplásmico de especies vegetales.
- No mantener almacenado por mucho tiempo el metabolito tóxico del hongo, aún y cuando no haya antecedentes precisos que indiquen que el tiempo de almacenaje de las toxinas ocasione alguna disminución del efecto dañino sobre material vegetal.
- Utilizar técnicas de medición más precisas cuando se evalúen las variables de estudio. Se recomienda que al utilizar la variable incremento en peso fresco, la medición del peso inicial sea directa, así como; en la medida posible, utilizar callos más pequeños y con un peso inicial uniforme.
- Implementar medidas más eficientes de asepsia cuando se desee trabajar con la técnica de cultivo de tejidos, para lograr obtener resultados más satisfactorios.

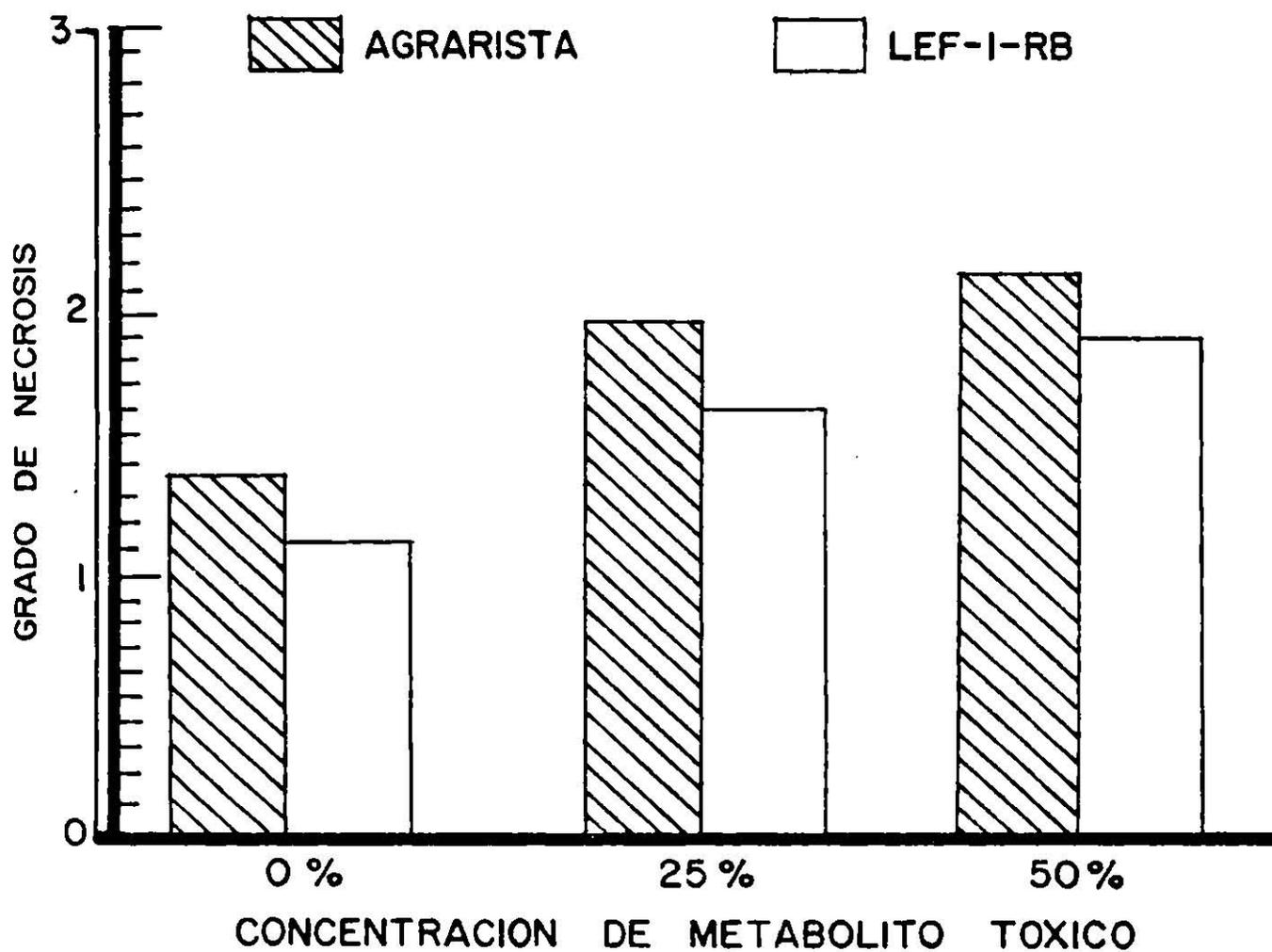
VII. APENDICE

Tabla 10. Medio utilizado para la inducción y mantenimiento de callo en los dos genotipos de frijol evaluados durante el experimento.

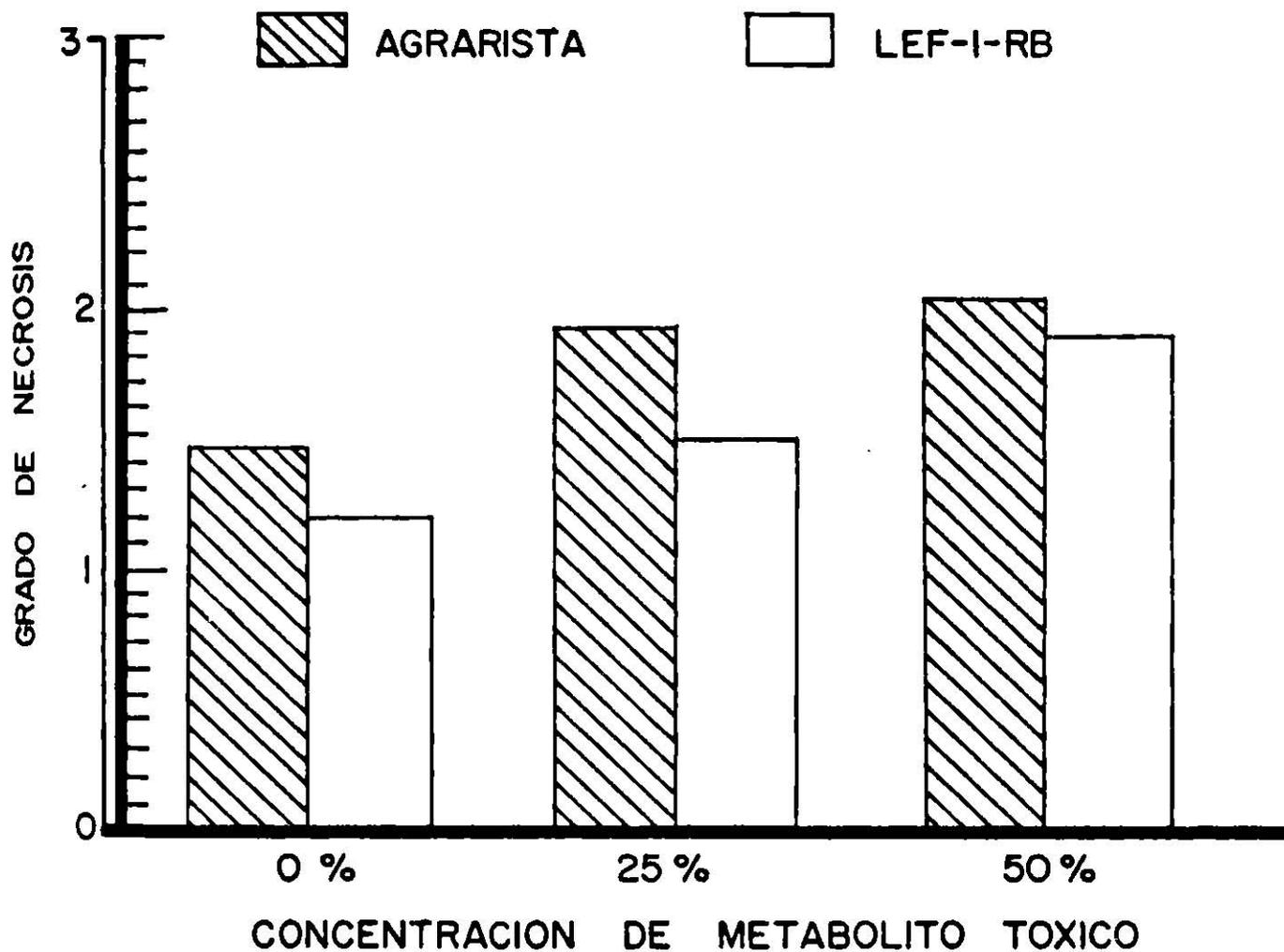
	<u>mg/lto.</u>
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1650.000
Nitrato de potasio (KNO_3)	1900.000
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.600
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370.000
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.900
Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Cloruro de calcio (CaCl_2) anhidro	330.000
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170.000
Acido bórico (H_3BO_3)	6.200
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.250
E.D.T.A. Sal disódica (Na_2EDTA)	37.300
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.800
Myo-Inositol	100.000
Thiamina	0.100
Piridoxina	0.500
Acido nicotínico	0.500
Cinetina	0.300
Acido 2,4-Dicloro fenoxiacético (2,4-D)	0.500
Acido indolacético (AIA)	5.000
Sacarosa	30000.000
Gel (Gelrite)	2000.000



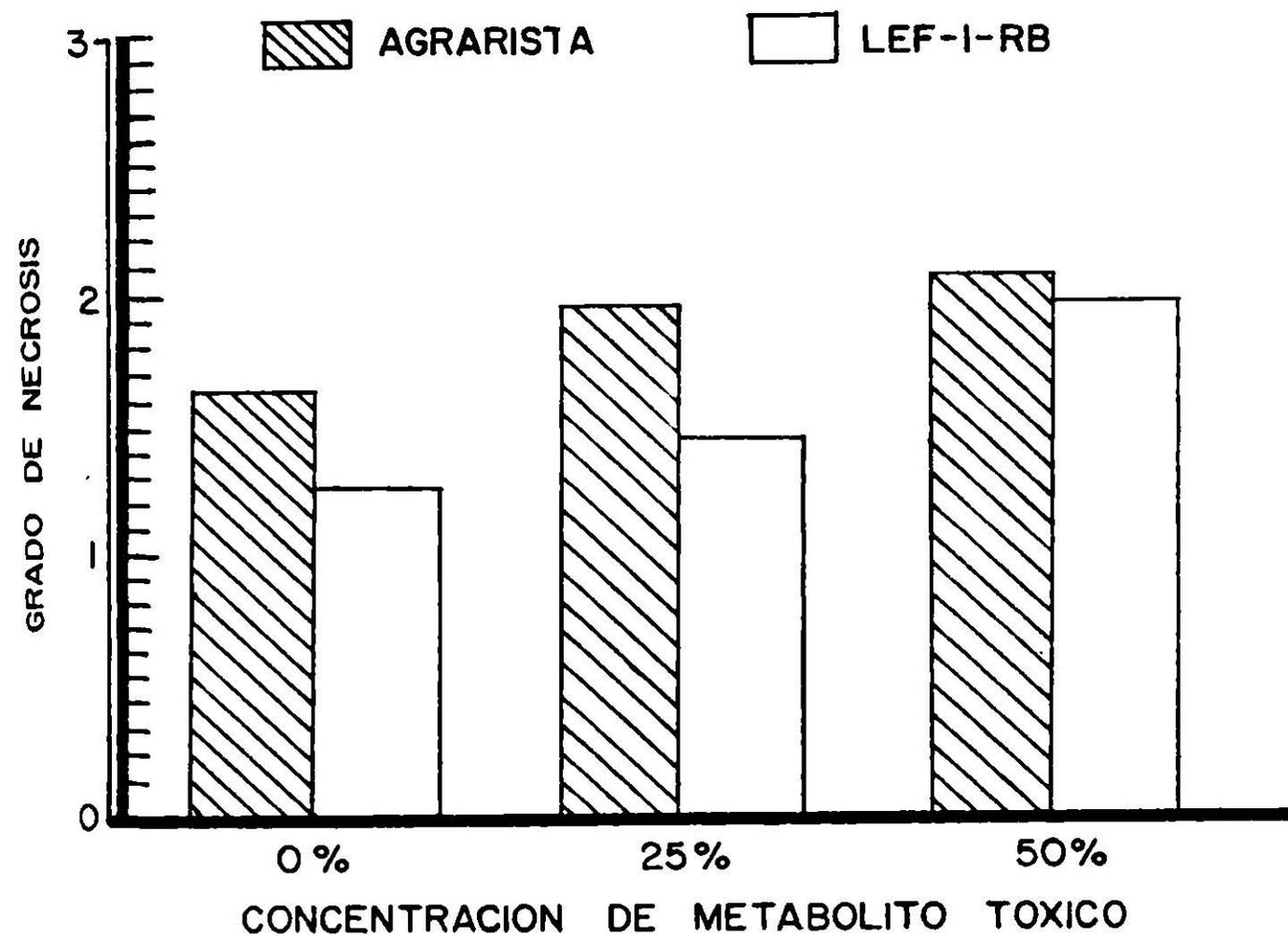
Gráfica 1. Relación del incremento en peso fresco y tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina en callos de dos genotipos de frijol -- después de 21 días de exposición.



Gráfica 2. Relación del grado de necrosis y tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo *M. phaseolina* - en callos de dos genotipos de frijol después de 7 días de exposición.



Gráfica 3. Relación del grado de necrosis y tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo M. phaseolina - en callos de dos genotipos de frijol después de 14-días de exposición.



Gráfica 4. Relación del grado de necrosis y tres concentraciones del metabolito tóxico del hongo *M. phaseolina* - en callos de dos genotipos de frijol después de 21 días de exposición.

VIII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Agrios, G.N. 1985, Fitopatología, Ed. LIMUSA, México.
2. Constabel, F., 1984, Callus Culture: Induction and Maintenance, in: Vasil, I.K., Cell Culture and Somatic Cell - Genetics of Plants, Vol. I, Academic Press, New York.
3. Crispin, A.M., Sifuentes, J.A. y Campos, J.A., 1976, Enfermedades y Plagas del Frijol en México, INIA-SARH, Folleto de Divulgación No. 39.
4. Davidonis, G.H., et al., 1982, Biological Properties of D—Amino Acid Conjugates of 2,4-D, Plant Physiol. 70:357-360.
5. De la Garza, J.L., y Díaz, A., 1989. Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid, un Patógeno Importante en los Cultivos, Facultad de Agronomía UANL, Folleto Técnico No.2 Marín, N.L.
6. Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B., 1978, Biology and Pathology of Macrophomina phaseolina, Univ. Fed. de Viosa, Brasil.
7. Díaz, A., 1984, Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid, Agente Causal de la Pudrición Carbonosa del Frijol Phaseo

lus vulgaris L. en el Norte de Tamaulipas, Agric. Tec. Mex. 10:87-98.

8. Dixon, R.A., 1985, Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures, in: Dixon, R.A., Plant Cell - a Practical Approach, IRL Press, Washington D.C.
9. González, M.A., 1990, Influencia de la Patotoxina del Hongo Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid en Plántulas de Frijol (Phaseolus spp.), Tesis Licenciatura sin publicar, Facultad de Agronomía U.A.N.L.
10. Gray, L.F., et al, 1986. Reaction of Soybean Callus to Cultures Filtrates of Phialophora gregata, Plant Science-47:45-55.
11. Green, C.G., 1984, Selección de Material Germoplásmico de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) Mediante el Uso de la Patotoxina del Hongo Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid Bajo Condiciones de Laboratorio, Tesis M.C. sin publicar, DCAM-ITESM, Monterrey, N.L.
12. Gutiérrez, H., Miranda, I. y Gaona, H., 1989, Efecto del Metabolito Tóxico de Macrophomina phaseolina (Tassi)Goid en Callos de Diferentes Genotipos de Frijol, Memorias del XVI Congreso Nacional de Fitopatología, Colegio de Post-Graduados, Montecillos, México.

13. Hernández, N.A., 1985, Evaluación de Material Germoplásmico de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) a la "Putridión Carbonosa" Mediante el Uso de la Patotoxina del Agente -- Causal Macrophomina phaseolina (Tassi)Goid Bajo Condiciones de Laboratorio, Tesis Licenciatura sin Publicar, ITESM, Monterrey, N.L.

14. Holliday, M.J. and Klarman, W.L., 1979, Expression of Disease Reaction Types in Soybean Callus from Resistant and Susceptible Plants, *Phytopatology* 69:576-578.

15. Hurtado, D.V. y Merino, M.E., 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales, Ed. Trillas, México.

16. Mok, M.C. et al., 1980. Cytokinin Autonomy in Tissue Cultures of Phaseolus: a Genotype Specific and Heritable -- Trait, *Genetics* 94:675-686.

17. Mok, M.C., et al., 1982, Cytokinin Structure-Activity Relationships and the Metabolism of N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)Adenosine-8-¹⁴C in Phaseolus Callus Tissues, *Plant Physiology*. 70:173-178.

18. Moreno, I.M., 1988, Selección de callos de Cártamo (Carthamus tinctorius L.) Resistentes a la Patotoxina de Alternaria carthami Chowdhury, Tesis M.C. sin Publicar, DCAM-ITESM, Monterrey, N.L.

19. Murashige, T., 1974, Plant Propagation Through Tissue Cultures, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
20. Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
21. Narayanaswamy, S., 1977, Regeneration of Plants from Tissue Cultures, in: Reiner, J. and Y.P.S., Bajaj, Applied -- and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
22. Salinas, S., 1979, Evaluación de la Resistencia de Seis Variedades de Tomate (Lycopersicum esculentum Mill) a Alternaria solani (Elly G. Martin) L.R. Jones y Grant-Empleando el Filtrado Tóxico del Hongo, Tesis M.C. sin Publicar, DCAM-ITESM, Monterrey, N.L.
23. Schaeffer, W., 1984, Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology, *In Vitro* 20:19-24.
24. Schwartz, F.H. y Gálvez, G.E., 1980, Problemas de Producción del Frijol (Enfermedades , Insectos, Limitaciones Edáficas y Climáticas de Phaseolus vulgaris L.), CIAT, Cali, Colombia.

25. Tarr, S.A., 1972. Principles of plant pathology, Winchester Press, New York.

26. Tisserat, R., 1985, Embryogenesis, Organogenesis and Plant-Regeneration, in: R.A., Dixon, Plant Cell a Practical - Approach, IRL Press, Washington, D.C.

