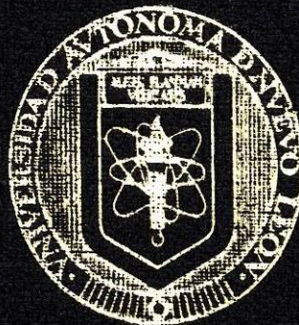


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



REGENERACION *in vitro* DE CUATRO GENOTIPOS
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A PARTIR
DE BROTES APICALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA:

FELIPE DE JESUS MARTINEZ ARROYO

MARIN, N. L.

FEBRERO DE 1992

T

SB327

M371

c 1



1080061989

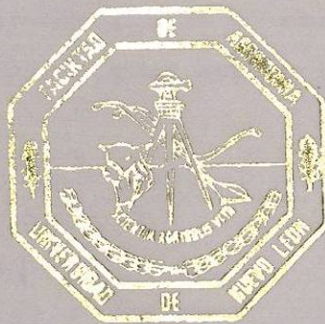


Faint, illegible text or a watermark spanning across the middle of the page, possibly reading "UNIVERSITY OF CHICAGO".

T
F5E02
HCM

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE AGRONOMIA



TESIS ELEGIDA POR FOLIO DE JESUS MARTINEZ ARROYO, ACEPTADA
Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

REGENERACION in vitro DE CUATRO GENOTIPOS
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) A PARTIR
DE BROTES APICALES

TESIS

Biól. M.C. *[Signature]* Ing. M.C. Omar C. Biverado G.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA:

FELIPE DE JESUS MARTINEZ ARROYO

10944m

MARIN, N. L.

FEBRERO DE 1992

T
SB 327
M371

040-633
FA3
1992
C.5



Biblioteca Central
Magna Solidaridad

F tesis



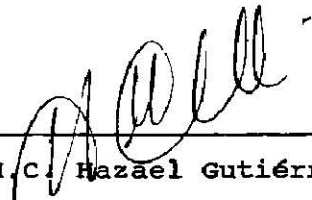
BU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

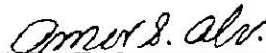
FACULTAD DE AGRONOMIA

TESIS ELEBORADA POR FELIPE DE JESUS MARTINEZ ARROYO, ACEPTADA
Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

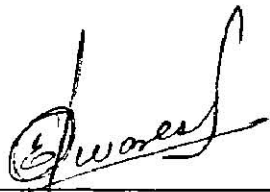
COMITE SUPERVISOR DE TESIS



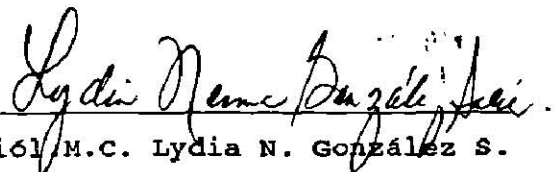
Biól.M.C. Hazael Gutiérrez M.
Asesor Principal



Ing.M.C. Omar G. Alvarado G.
Asesor Auxiliar



Dr. Emilio Olivares Sáenz
Asesor Estadístico



Biól.M.C. Lydia N. González S.
Asesor Externo

Marín, N.L. Febrero de 1992.

DEDICATORIAS

A Dios nuestro Señor:

Tú que eres tan grande; gracias por iluminarme en todo el camino de mi vida, dándome la salud y entendimiento que me permitieron llegar al término de mi carrera profesional, para felicidad de mi familia y para ayudar a mi prójimo.

A mis padres:

Sr. Jesús Martínez García.

Sra. María de la Luz Arroyo Pacheco.

Quienes son la inspiración de mis actos y el motivo para seguir superándome. Gracias por la vida, su apoyo, consejos, bendiciones y comprensión, porque de ustedes aprendí el sentido de responsabilidad en toda actividad desempeñada.

A mis hermanos:

Victoria

Irene

José Refugio

Julio

Rosa Isela

José Angel

Karla Verónica

Sandra Ericka

Luz Adriana

Gracias por su compañía, todo el tiempo que compartimos juntos; y que en nuestra hermandad, nos inculcamos el respeto, la devoción y la ayuda mutua; para seguir unidos, gracias por ser así.

A mi novia:

Srita. Myrna de la Vega Reséndiz.

A quien admiro por su forma de ser; quién me aconseja y apoya en todas mis decisiones, comparte mis alegrías y considera mis sufrimientos como suyos. A tí; que das alegría a mi vida, TE AMO.

A mi hermana y su esposo:

Sr. Concepción González Pérez.

Sra. Ma. del Rosario Martínez Arroyo.

Porque si no fuera por su ayuda; no hubiera realizado mis estudios, gracias por acojerme y gracias por todo.

A la familia Esparza Rodríguez:

Sra. María Rojas Cruz.

Sr. Juan Esparza Rodríguez.

Sra. Juana María Rodríguez Cruz.

Jesús Oscar y Lupita

José Martín y Miriam

Carmina

Juan Angel

Gerardo

Guadalupe Araceli

Edgar

Ericka

Ramsés

Gracias por permitirme ser su amigo; por considerarme hijo y hermano. Gracias por haber hecho de su hogar mi propio hogar, gracias por sus consejos y bendiciones. Siempre los recordaré como mi segunda familia.

A la generación 85-89:

A todos los miembros de la especialidad de Fitotecnia, principalmente a Mario Díaz Landeros, Juan José Gómez Leiva, Rafael Antonio Garza Peña, Venancio Pérez Zúñiga, Rubén Tello Enríquez, José Santos Rojas Domínguez, Ernesto Callejas Aguilera, Joel Rodríguez López, Jorge Alberto Rodríguez Chávez, y Juan Javier García García.

Juntos formamos una generación con gran responsabilidad y deseos de ayudar; para corresponder de algún modo, toda la ayuda que nos ha dado México.

A mis amigas de la F.C.B. y F.A.U.A.N.L.:

Diana Luisa Ortiz Ríos
Cristina Hernández Fuentes
Magdalena Banda Alonso
Judith Díaz González
Nemeth Olimpia Gutiérrez Pérez
Biól. Adriana Zúñiga Constantino
Ing. M.C. Adriana Ramos García

Quienes fueron los pilares que sostuvieron mi fé y voluntad; alentándome a seguir adelante. Gracias por brindarme su amistad y aunque lleguemos a separarnos; de algún modo u otro, ya son parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía U.A.N.L.:

A todos los compañeros y maestros, principalmente al:

Biól. M.C. Hazael Gutiérrez Mauleón, por inculcarme el interés por la investigación, por su asesoría y su acertada participación en la realización de éste experimento.

M.C. Omar Guadalupe Alvarado Gómez por sus ideas aportadas y consejos que contribuyeron a culminar el experimento.

Dr. Emilio Olivares Sáenz por la ayuda brindada en el análisis estadístico e interpretación de los resultados.

A la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.:

principalmente al:

M.C. Luis Galán Wong; jefe del Departamento de Microbiología e Inmunología, por las facilidades otorgadas para la realización del experimento.

Biól. M.C. Lydia Norma González Solís; Jefe del área de Micología y Fitopatología, por su interés incesante en la realización del experimento, proporcionando la ayuda intelectual y material; así como también sus consejos que me servirán posteriormente en el ejercicio de mi profesión.

INDICE

	pag.
RESUMEN.....	I
I. INTRODUCCION.....	1
II. LITERATURA REVISADA.....	3
2.1. Aspectos generales de la regeneración <i>in vitro</i>	3
2.2. Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	5
2.2.1. Composición química del medio de cultivo.....	5
2.2.1.1. Sales minerales.....	5
2.2.1.2. Vitaminas.....	6
2.2.1.3. Carbohidratos.....	7
2.2.1.4. Reguladores de crecimiento.....	8
2.2.1.5. Otros compuestos orgánicos.....	12
2.2.2. Características físicas del medio de cultivo.....	13
2.2.2.1. Formulaciones líquidas y sólidas.....	14
2.2.2.2. Influencia del pH.....	15
2.2.2.3. Cantidad de medio, volúmen de los recipientes y esterilización.....	15
2.2.3. Control del ambiente de cultivo.....	16
2.2.3.1. Efecto de la luz.....	16
2.2.3.2. Efecto de la temperatura.....	17
2.2.3.3. Proporción O ₂ /CO ₂ /etileno.....	18

	pag.
2.2.4. Elección del explante.....	18
2.2.5. Desinfestación del explante.....	19
2.3. Aplicaciones de la propagación	
<i>in vitro</i>	20
2.3.1. Rápida propagación clonal.....	21
2.3.2. Eliminación de enfermedades.....	22
2.3.3. El mejoramiento genético de los cultivos.....	23
2.3.3.1. Selección directa <i>in vitro</i>	23
2.3.3.2. Hibridación y cultivo de protoplastos.....	24
2.3.4. Preservación de germoplasma.....	26
2.3.5. Obtención de productos químicos..	27
2.3.6. Estudios fisiológicos.....	27
2.4. Perspectivas futuras.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Materiales.....	31
3.1.1. Material y equipo.....	31
3.1.2. Reactivos.....	31
3.1.3. Material biológico.....	31
3.1.4. Diseño experimental.....	32
3.1.5. Modelo estadístico.....	32
3.1.6. Descripción de tratamientos.....	32
3.1.7. Variables estudiadas.....	34
3.2. Métodos.....	35
3.2.1. Técnicas y procedimiento para el establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i>	35
3.2.1.1. Preparación de soluciones concentradas.	35
3.2.1.2. Preparación de medios de cultivo.....	35

	pag.
3.2.1.3. Desinfestación y siembra de semilla.....	37
3.2.1.4. Extacción de explantes...	39
3.2.1.5. Etapa I: Inducción de brotación.....	39
3.2.1.6. Etapa II: Multiplicación de brotes.....	40
3.2.1.7. Etapa III: Enraizamiento de brotes.....	40
3.2.1.8. Etapa IV: Aclimatación de plántulas regeneradas y su transfe- rencia al suelo.....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
4.1. Resultados.....	42
4.1.1. Etapa I: Inducción de brotación...	42
4.1.2. Etapa II: Multiplicación de brotes.....	47
4.1.3. Etapa III: Enraizamiento de brotes.....	49
4.1.4. Etapa IV: Aclimatación de plántulas regeneradas y su transferencia al suelo.....	54
4.2. Discusión.....	54
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
5.1. Conclusiones.....	61
5.2. Recomendaciones.....	62
VI. BIBLIOGRAFIA.....	63
VII. APENDICE.....	71

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

CUADRO		pag.
1	Mezcla de sales de Murashige-Skoog (MS), utilizada para la preparación del medio básico.....	7
2	vitaminas utilizadas en la preparación de medios de cultivo.....	8
3	Reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, dosis y su efecto general en la organogénesis.....	9
4	Compuestos orgánicos y preparaciones de composición indefinida utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.....	13
5	Análisis de varianza para la variable desarrollo de callo basal en los brotes apicales de los cuatro genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.....	44
6	Análisis de varianza para la variable número de brotes por explante producidos por los brotes apicales de los cuatro genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.....	45

- 7 Análisis de varianza para la variable longitud de los brotes (mm) producidos por los brotes apicales de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I..... 45
- 8 Efecto promedio ocasionado por los medios BI2 y BN3 sobre la inducción de brotación en los explantes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) después 21 días de cultivados en la Etapa I..... 46
- 9 Efecto promedio ocasionado por los medios BI2 y BN3 sobre la multiplicación de brotes brotes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días días de recultivados los brotes obtenidos en la Etapa I..... 48
- 10 Efecto promedio ocasionado por los medios A, B, C y D sobre la formación de raíces en los brotes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) obtenidos en la Etapa I, después de 21 días de recultivados..... 52
- 11 Efecto del medio D sobre la formación de raíces en los brotes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) obtenidos en la Etapa II, después de 21 días de subcultivados..... 53

1A	Material y equipo más importante utilizado para la realización del experimento.....	72
2A	Preparación de soluciones concentradas de sales de MS, vitaminas y reguladores de crecimiento empleadas en éste experimento.....	73
3A	Cantidades de los componentes para la preparación de los medios de cultivo ensayados en éste experimento (componente/L de medio).....	75

FIGURAS

FIGURA

1	Diagrama de flujo mostrando la metodología utilizada en el experimento.....	38
2	Número de brotes por explante obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.....	43
3	Longitud de los brotes obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.....	43

- 4 Desarrollo de callo basal en los brotes apicales de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I..... 47
- 5 Número de brotes por explante obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa II..... 50
- 6 Longitud de los brotes obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa II..... 50
- 7 Aspecto general de los brotes obtenidos en la Etapa I de la variedad Ciateño a los 14 días de cultivada en el medio BN3. Inducción de brotación y desarrollo de callo en la parte basal del brote..... 51
- 8 Masa de brotes obtenidos en la Etapa II de los diferentes genotipos de frijol, con poca longitud, abundante desarrollo de callo y oxidación de tejidos..... 51
- 9 Enraizamiento de brotes provenientes de la Etapa I. Variedad Pinto Norteño a los 30 días de cultivada en el medio MS+Cinetina+AIB, mostrando la elongación del brote y el desarrollo de raíces..... 55

10	Aspecto general del enraizamiento de los brotes provenientes de la Etapa II. Variedad Pinto Norteño a los 21 días de cultivada en el medio MS+Cinetina+AIB.....	55
----	---	----

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Laboratorio de Fitopatología y Micología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, durante el período comprendido de enero de 1990 a septiembre de 1991.

Se logró establecer una metodología para la regeneración *in vitro* de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando como explantes brotes apicales de 1.0 cm de longitud, obtenidos de plántulas con siete días de germinación de los genotipos Selección 4, Pinto Norteño, Ciateño y la línea LEF-1-RB; cultivados en dos medios de cultivo para inducción y multiplicación de brotes; constituidos por el medio básico de Murashige-Skoog (MS) ensayándose dos combinaciones de Benciladenina (BA) con Acido Indolacético (AIA) y Acido Naftalenacético (ANA); y también, cuatro para enraizamiento, el medio MS básico sólo o en combinación con Cinetina, AIA, ANA y Acido Indolbutírico (AIB).

Los explantes se desinfectaron previamente en una solución de Cloralex^{MR} 10% v/v + 20 gotas de Tween 20 por litro de solución; enjuagados cuatro veces con agua destilada estéril y posteriormente sometidos a una solución antioxidante compuesta por ácido cítrico 150 mg/L y ácido ascórbico 100 mg/L.

En las etapas de inducción y multiplicación de brotes, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas: desarrollo de callo basal, número de brotes por explante y longitud de los mismos, obteniéndose de 2.0-2.5 brotes por explante, con una longitud de 15.37-17.14 mm de los cuatro genotipos en la etapa de inducción de brotación, y de 10.0-22.5 brotes por explante,

con una longitud promedio de 5.09 mm en la etapa de multiplicación de brotes. En lo que respecta al enraizamiento de los brotes provenientes de las etapas de inducción y multiplicación; pudo notarse que la variedad Pinto Norteño cultivada en el medio MS básico + Cinetina 0.5 mg/L + AIB 3.0 mg/L, fue la que más sobresalió, para ésta y las otras etapas, seguida por el Ciataño, Selección 4 y por último la línea LEF-1-RB.

En las tres etapas se presentó la formación de callo basal en los brotes cultivados; disminuyendo en la etapa de enraizamiento, donde existió una alta correlación entre la formación de callo y el desarrollo de raíces; excepto en la variedad Pinto Norteño cultivada en el medio MS básico, donde se presentó el desarrollo de raíces sin la formación de callo, incluso, en la etapa de multiplicación, algunos brotes fueron el producto de la rediferenciación de éste.

En éste experimento se obtuvo un éxito aceptable en la regeneración de plántulas hasta la fase *in vitro*, observándose una baja sobrevivencia de éstas al transferirse a suelo para su aclimatación; sin embargo, ésta última etapa no estaba contemplada dentro de los objetivos iniciales del experimento, sólo se consideró a manera de observación.

Se concluye en ésta investigación que la metodología desarrollada proporciona un esquema sencillo para la regeneración de plántulas de frijol a partir de brotes apicales. Sin embargo; es necesario seguir investigando para eficientizar la técnica y superar las necrosis leves que se presentaron durante las tres etapas *in vitro*, así como el control adecuado de las las condiciones de incubación, fotoperíodo y temperatura para de ésta forma aumentar la eficiencia del sistema de regeneración aquí utilizado

I. INTRODUCCION.

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); es uno de los granos básicos incluidos en la dieta del pueblo mexicano y latinoamericano, sólomente superado por el maíz y el sorgo en superficie sembrada entre los cultivos de ciclo anual. Sin embargo; existen diversos factores que afectan la producción nacional, donde a partir de 1970 hasta 1986, existió un déficit del 30%; por lo que fue necesario recurrir al mercado externo para cubrirlo. Entre los factores que explican ésta baja productividad se encuentran, principalmente: que el cultivo es afectado por las sequías, ya que cerca del 90% de la superficie destinada al cultivo del frijol se ubica en áreas de temporal; conjuntamente a esto, la práctica de una agricultura tradicional carente de la tecnología necesaria para incrementar la producción. Otros factores no menos importantes son; la pobre fertilidad del suelo, la incidencia de plagas y enfermedades (28).

Por lo antes expuesto; es un gran reto para el país buscar nuevas alternativas para aumentar la producción en el campo; ya que la demanda de ésta leguminosa es cada vez mayor, buscar caminos que tiendan a obtener mayor variabilidad genética que optimicen los programas de mejoramiento y así obtener variedades de alto rendimiento tolerantes a sequía y salinidad, así como resistentes a plagas y enfermedades. Una alternativa es la utilización del cultivo de tejidos vegetales. En México las primeras actividades relacionadas con ésta técnica se iniciaron en 1970 en el Colegio de Postgraduados de Chapingo y posteriormente en otras instituciones educativas como la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Politécnico Nacional.

Es importante realizar investigaciones en el área de la Biotecnología; los tiempos modernos así lo exigen, es por

esto que se planteó ésta investigación de regeneración de plantas de frijol, ya que los trabajos que se han realizado a nivel Nacional y Mundial son muy escasos; del mismo modo, tratar de que ésta técnica resulte eficiente y útil para el área agronómica.

Por medio de la regeneración de plantas de frijol *in vitro*, se pueden producir individuos haploides y heterocigotos que al incluirlos en los programas de mejoramiento, se tiene la posibilidad de reducir el tiempo requerido para completar cada ciclo de selección. Otras aplicaciones potenciales son la selección directa *in vitro* de individuos sobresalientes, polinización o fertilización *in vitro* y la preservación de germoplasma, entre otras.

Para la realización del experimento se plantearon los objetivos siguientes: 1) Determinar el medio nutritivo óptimo para producir brotes y raíz utilizando brotes apicales de frijol y 2) comparar diferentes genotipos de frijol en cuanto a su respuesta regenerativa *in vitro* para desarrollar una metodología de micropropagación eficiente.

II. LITERATURA REVISADA.

2.1. Aspectos Generales de la Regeneración *in vitro*.

Al hablar de regeneración; se tienen que considerar algunos aspectos fundamentales relacionados con la teoría celular, referidos principalmente a la totipotencialidad de las células vegetales. La organización estructural de cada órgano o tejido en particular, es un efecto de la información genética contenida en cada célula del tejido y cada una de esas células es capaz de expresar su potencial genético para regenerar una planta completa (5,6). Tomando como base ésta característica; los investigadores consideraban que si se lograba aislar una célula o grupos de ellas, se podían desarrollar metodologías *in vitro* manipulando adecuadamente su ambiente. La naturaleza de tales manipulaciones sería causar un estímulo para obtener la diferenciación celular. Así; la propagación *in vitro*, micropropagación o cultivo de tejidos vegetales, consiste en el cultivo *in vitro* de las partes de una planta que pueden ser células, protoplastos o tejidos especializados (denominados explantes), bajo condiciones asépticas en un medio nutritivo adecuado y ambiente controlado (12,37,50).

Gottlieb Haberlandt; en 1902, fue la primera persona que aisló e intentó cultivar células vegetales; sin embargo, sus experimentos fracasaron. A pesar de ello, el mismo Haberlandt concluyó que probablemente se requieren "enzimas de crecimiento" para estimular la división celular (6). A partir de 1939; se empezaron a obtener los primeros éxitos con los trabajos realizados por Gautheret, Nobécourt, White, Skoog, etc. quienes se dedicaron a realizar en ésta etapa; estudios químicos, composición del medio y nutrición celular, culminando con el trabajo clásico de Skoog y Miller en 1957. Así; la introducción de medios nutritivos definidos y la sofisticación de la metodología del cultivo *in vitro*, abría

los horizontes para su aplicación científica y comercial.

Otro concepto es el de la regeneración *per se*; considerado como un proceso sistemático donde a partir del explante cultivado; vía embriogénesis u organogénesis, se puede obtener una planta completa. La regeneración por embriogénesis consiste en que el embrión somático obtenido, es una estructura bipolar independiente y no es físicamente dependiente del tejido que lo originó, en cambio la organogénesis se refiere a la formación y crecimiento de brotes a partir de callo o no, crecimiento de yemas axilares generadas de un ápice cultivado y su subsecuente enraizamiento adventicio. Los brotes son una estructura unipolar y están físicamente conectados con el tejido que les dió origen (5,23,27,37,50).

Tisserat (50) y Hussey (27), consideran que la regeneración a través de la organogénesis puede lograrse por medio de los siguientes modelos:

- 1). Producción de órganos adventicios originados de callo derivado éste a su vez del explante (brotes adventicios vía callo).
- 2). Emergencia de órganos adventicios directamente del explante sin la intervención de la fase de callo (regeneración directamente del explante cultivado).
- 3). Producción de plántulas a partir del desarrollo de yemas axilares (aumentando la brotación axilar *in vitro*).

Diferenciar estos modelos de regeneración es importante porque se puede utilizar uno impropio que afectaría la uniformidad genética de las plantas producidas cuando esto no se desea. La afirmación de que se conserva la uniformidad genética en las plantas producidas es válida sólo cuando la

regeneración se realiza por medio del desarrollo de yemas axilares o brotes adventicios directamente del explante. Cuando la formación de brotes es inducida a partir de tejido calloso, la probabilidad de ocurrencia de cambios genéticos es muy alta, aumentando cada vez más con el tiempo y subcultivos a que sea sometido el mismo. Tales cambios pueden ser de origen mutagénico, cambios en los niveles de ploidía y hasta de tipo epigenético ocasionados por condiciones anormales del ambiente de cultivo y balance hormonal, expresándose fenotípicamente en plantas con hojas anormales, senescencia prematura, aumento de la brotación y alteraciones de la filotaxia, entre otras (5,6,7,15,23,50). Con base en todo lo anterior, en ésta investigación se prefirió utilizar el modelo 2.

2.2. Factores que Influyen en el Cultivo *in vitro*.

En los estudios realizados sobre la organogénesis, se ha establecido que el éxito depende de tres factores fundamentales que son: la composición química y las características físicas del medio de cultivo, control del ambiente de cultivo y la elección del explante (5,27,37,50).

2.2.1. Composición Química del Medio de Cultivo.

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para la organogénesis. Los compuestos esenciales son clasificados en cinco grupos: sales minerales, vitaminas, azúcares, reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos (1,12,18,37,48,).

2.2.1.1. Sales Minerales.

Las sales utilizadas para suplementar los requerimientos de macronutrientes y micronutrientes deben ser de una gran pureza o "grado reactivo". Esta mezcla de sales minerales es

considerada como medio básico, ya que su composición siempre va a permanecer constante.

Después de Haberlandt; se encontraron varios medios, algunos para usos específicos y otros para diferentes propósitos. Estos medios son llamados generalmente con el nombre del (los) investigador (es) que lo desarrolló.

Murashige y Skoog (39), fueron capaces de identificar los factores de crecimiento y fuentes de sales minerales determinando el medio más adecuado para obtener organogénesis en tejidos de tabaco cultivados *in vitro*. Obtuvieron callo utilizando cortes de médula de tallo aproximadamente de 2 mm; cultivados en el medio, determinaron el tipo y las cantidades de sales minerales y compuestos orgánicos ajustadas y adaptadas a los requerimientos más generales de la mayoría de las especies (cuadro 1). En ocasiones es necesario hacer modificaciones en alguno de los constituyentes para satisfacer requerimientos específicos.

2.2.1.2. Vitaminas.

Las vitaminas tienen un papel importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Sólomente la tiamina es considerada como esencial, mientras que otras como el ácido nicotínico y piridoxina son agregadas para estimular procesos específicos; sin embargo se incluyen a manera de prevención. El ácido cítrico y ascórbico son utilizados como antioxidantes para evitar el obscurecimiento de los tejidos, agregándose directamente al medio de cultivo o en tratamientos al explante (1,11,12,18,24,37). En el cuadro 2, se enlistan las vitaminas más utilizadas así como las cantidades recomendadas.

2.2.1.3. Carbohidratos.

En el cultivo *in vitro* el CO₂ es suplido en todo el ciclo de desarrollo por una fuente de carbono orgánica o carbohidratos. Todos los medios de cultivo requieren la presencia de azúcar en mayor o menor cantidad, por el hecho de que los explantes cultivados *in vitro*, son inducidos a desarrollarse heterotróficamente al introducirlos en un microambiente donde se interrumpe significativamente el intercambio y disponibilidad del CO₂; necesario para el proceso normal de la fotosíntesis, disminuyendo ésta hasta casi desaparecer (6,51).

Cuadro 1. Mezcla de sales minerales de Murashige-Skoog (MS), utilizada para la preparación del medio básico.

COMPUESTO	CONCENTRACION (mg/L)
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1650.0
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900.0
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370.0
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .H ₂ O)	16.9
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8.6
Sulfato cúprico (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0.025
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O) [Anhidro]	440.0 [330]
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.025
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	170.0
Acido bórico (H ₃ BO ₃)	6.2
Molibdato de sodio (Na ₂ MOO ₄ .2H ₂ O)	0.25
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27.8
Acido etilendiaminotetracético (Na ₂ EDTA)	37.3

FUENTE: MURASHIGE-SKOOG (39).

Los carbohidratos aparentemente tienen un papel biofísico y bioquímico en la formación de brotes, encontrándose que existe una acumulación de almidón antes de la formación de brotes (5,37). La sacarosa es la que se ha utilizado con mayor frecuencia debido a que se han obtenido los mejores resultados sobre otros azúcares como la glucosa, fructuosa, maltosa, etc. La concentración de sacarosa en el medio de cultivo varía de 20,000 a 45,000 mg/L.

Cuadro 2. Vitaminas utilizadas en la preparación de medios de cultivo.

VITAMINA	CONCENTRACION (mg/L)	
Tiamina.HCl	0.1	- 1.0
Piridoxina.HCl	0.1	- 1.0
Acido nicotínico	0.5	- 1.0
Riboflavina	0.01	- 0.2
Biotina	0.0002	- 0.1
Acido fólico	0.0003	- 1.0

FUENTE: A.W. DIMOCK (11); HUANG Y MURASHIGE (24).

2.2.1.4. Reguladores de Crecimiento.

Cuando los explantes (células, tejidos u órganos) son aislados de la planta madre para cultivarlos *in vitro*, es necesario suministrar todos los compuestos que se encuentran en cantidades limitadas. Entre estos se encuentran las hormonas o reguladores de crecimiento, los cuales se clasifican en tres tipos: auxinas; citocininas y giberelinas, donde los dos primeros tienen especial importancia en el cultivo de tejidos vegetales (16,37). En el cuadro 3 se enlistan los reguladores de crecimiento, la dosis y su efecto general en la organogénesis.

Cuadro 3. Reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, dosis y su efecto general en la organogénesis.

REGULADORES DE CRECIMIENTO	CONCENTRACION (mg/L)	EFEECTO
AUXINAS	0.1-10.0	
Ac. Indol-3-acético (AIA)		Promueven la elongación celular, fa- vorecen la formación de callo.
Ac. α -Naftalenacético (ANA)		
Ac. Indol-3-butírico (AIB)		
Ac. 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)		
Ac. 2,4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T)		
Ac. Paraclorofenoxiacético (PCA)		
CITOCININAS	0.03-30.0	
N ⁶ -Furfurilaminopurina (Cinetina)		estimulan la división ce- lular, indu- cen la bro - tación axi - lar.
N ⁶ -Bencilaminopurina (BA o BAP)		
N ⁶ -4-hidroxi-3-metilbutil-2-enil- aminopurina (Zeatina)		
N ⁶ - γ,γ -dimetilalilaminopurina (2iP)		
GIBERELINAS	0.1-10.0	
Ac. Giberelico 3 (GA3)		promueven la expansión de células.
Ac. Giberelico 4 (GA4)		
Ac. Giberelico 7 (GA7)		
Ac. Giberelico 10 (GA10)		

FUENTE: BURGESS (6); A.W. DIMOCK (11).

Skoog y Tsui (47) propusieron que la formación de órganos y el subsecuente desarrollo son dependientes de los cambios cuantitativos en las concentraciones e interacciones de los nutrientes y otros factores que son esenciales para el crecimiento de las células.

Skoog y Miller; citados por Brown y Thorpe (5), concluyeron que las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento; especialmente auxinas y citocininas, proporcionan un mecanismo para la regulación de todos los tipos de crecimiento, incluyendo la formación de órganos. Es decir, una alta concentración de citocinina suprime la formación de raíces e incrementa la producción de brotes en callos de tabaco; y por el contrario, una alta concentración de auxina favorece la formación de raíz e inhibe el desarrollo de brotes.

A partir de lo anterior, se han realizado estudios en algunas leguminosas (frijol, soya, chícharo, haba, alfalfa, etc.) para evaluar las respuestas en determinados medios de cultivo y que a su vez ayuden a encontrar los requerimientos nutricionales de otras leguminosas consideradas como "recalcitrantes" a éste proceso.

Kartha et al. (30) utilizando meristemas apicales de frijol, obtuvieron regeneración en un medio libre de hormonas o solamente con ácido naftalenacético (ANA). La regeneración múltiple de yemas (15-30 yemas/meristemo) fue inducida con 10 μ M (2.25 mg/L) de benciladenina (BA); y posteriormente los brotes elongados produjeron raíces en un medio consistente de Murashige-Skoog (MS) 50% + 1.0 μ M (0.225 mg/L) de ácido indolacético (AIA).

Por su parte, Zieg (59) reportó que los cortes apicales de plántulas de soya, se desarrollaron mejor en términos de regeneración vegetativa cuando el 2,4-D y Cinetina estaban

presentes en el medio nutritivo. Las altas concentraciones de Cinetina estimularon el desarrollo de brotes, mientras que altas concentraciones de 2,4-D favorecieron el desarrollo de callo.

Martins y Sondahl (34) ensayaron 33 genotipos de frijol para obtener regeneración *in vitro*. Ellos utilizaron meristemos apicales de 1.0-2.0 mm de longitud con 3 o 4 primordios foliares cultivados en el medio B5 de Gamborg et al. suplementado con 0.5 μM (0.112 mg/L) de BA. Durante la primera etapa del cultivo, se obtuvo la formación de callo, raíces profusas y/o desarrollo de yemas, posteriormente en el segundo cultivo se produjeron de 5.0-5.2 yemas/meristemo cuando se mantuvieron en el cuarto de crecimiento y de 8.7 a 15.6 en el invernadero.

Rubluo y Kartha (41) encontraron diferencias genotípicas en términos de regeneración (yemas/meristemo) entre *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus* y *P. lunatus*, cultivados en medios suplementados con BA, Cinetina, Zeatina, y 2iP o en combinación con ANA, AIA y ácido indolbutírico (AIB). Los meristemos de *P. vulgaris* mostraron una mejor respuesta en términos de regeneración de brotes (65%) cuando fueron cultivados en medios suplementados con 10.0 μM (2.25 mg/L) de BA más AIA o AIB a temperatura constante de 26 °C.

Saam, Hosfield y Saunders (42) utilizando brotes apicales de frijol de 1.0-1.5 cm de longitud y cultivados en el medio básico MS, encontraron que la combinación de BA (3.0 mg/L) + ANA (0.1 mg/L) fue la más efectiva para la multiplicación de brotes. Con altas concentraciones de BA o Cinetina (arriba de 10.0 mg/L) la producción de brotes y la elongación de entrenudos disminuyó marcadamente desarrollandose cultivos en forma de roseta con yemas múltiples. Además, se desarrolló callo basal en algunos de los tratamientos. Los brotes fueron enraizados en el medio MS

y las plántulas obtenidas se llevaron hasta la madurez en el invernadero produciendo flores fértiles, vainas y semillas.

2.2.1.5. Otros Compuestos Orgánicos.

Son muchos los compuestos orgánicos que pueden agregarse al medio para aumentar el éxito de la organogénesis; cuando los resultados obtenidos no sean satisfactorios o cuando se desea un estímulo adicional. Entre estos compuestos se encuentran los aminoácidos o sus respectivas amidas como fuente de nitrógeno orgánico. Es muy común que se le agregue al medio glicina o sulfato de adenina para mejorar las respuestas en la diferenciación de brotes en algunas especies. Se ha comprobado también que otros aminoácidos tienen influencia en la formación de órganos. Tonin et al. (52), utilizando explantes de hoja de frijol de 4 mm² y cultivadas en un medio patrón MS + Cinetina 1.0 mg/L + AIA 5.0 mg/L ensayaron 13 aminoácidos y la interacción en grupos de tres. El medio patrón + arginina 60 mg/L + ácido aspártico 50 mg/L + cisteína 10 mg/L, promovió la morfogénesis óptima de raíces. Encontraron también que el desarrollo de callo ocurrió en el medio patrón con ácido glutámico 0.5 mg/L, glicina 25 mg/L e histidina 10 mg/L.

Otros compuestos y suplementos orgánicos son utilizados para enriquecer el medio; pero que por su gran variación de ingredientes o indefinida composición, no se tiene con certeza cual es su influencia sobre la organogénesis. El más utilizado de estos compuestos es el agua de coco, que probablemente contiene sustancias (aminoácidos naturales) que actúan sinérgicamente para mejorar el estímulo organogénico. Lopez Peralta (33) utilizó meristemos apicales y secciones de hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivados en medios nutritivos suplementados con aguamiel o agua de coco. Encontró que únicamente en el tejido de hoja de frijol se

indujo la producción de tejido radicular en el medio TMS con aguamiel. Sin embargo, el desarrollo de los cultivos fue más abundante en los medios patrón en comparación con los suplementados con aguamiel y agua de coco.

Otro compuesto muy utilizado es el mio-inositol; aunque no es esencial, se agrega al medio de cultivo a una concentración de 100 mg/L. En el cuadro 4 se señalan algunos compuestos orgánicos utilizados en cultivo de tejidos vegetales.

Cuadro 4. Compuestos orgánicos y preparaciones de composición indefinida utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.

COMPUESTO	CONCENTRACION	
	mg/L	ml/L
Agua de coco (endospermo líquido)		100-150
Aguamiel		100-150
Caseína hidrolizada	50-5000	
Lactoalbúmina	50-5000	
Peptona	50-5000	
Triptona	50-5000	
Extracto de levadura	50-5000	
Extracto de maltosa	50-5000	
Jugo de naranja		30-300
Jugo de tomate o V8		30-300
Pulpa de banana	1500	
Pulpa de papaya	1500	

FUENTE: A.W DIMOCK (11); HUANG Y MURASHIGE (24).

2.2.2. Características Físicas del Medio de Cultivo.

2.2.2.1. Formulaciones Líquidas y Sólidas.

La elección entre un medio líquido o sólido al igual que otras características del medio de cultivo se puede hacer arbitrariamente. Sin embargo, la elección dependerá muchas veces del tipo de explante y del estímulo de la organogénesis (12,37).

Las formulaciones líquidas pueden requerir agitación, esto cuando se refiere a células y callo en cultivos en suspensión, los que al ser sometidos a una agitación lenta (40-60 rpm) puede tenerse una mayor aireación y superficie de contacto con el medio nutritivo; incluso, por medio de ésta técnica, es posible obtener los metabolitos secundarios producidos por plantas de interés farmacéutico e industrial y también realizar bioensayos con sustancias inductoras de estrés, resistencia a las toxinas de hongos fitopatógenos, etc. (7,11,23,37).

Las formulaciones líquidas pueden ser también estacionarias, utilizándose por lo general, plataformas y puentes de papel filtro o fibra de vidrio para evitar que los explantes se sumerjan totalmente en el medio (11,37).

En las formulaciones sólidas, el agente solidificante más utilizado es el agar. La concentración del agar va a variar de acuerdo a su calidad, por lo que se debe procurar utilizarlo lo más purificado posible debido a que no todos son fisiológicamente inertes, sino que hay algunos que contienen sustancias contaminantes orgánicas e inorgánicas que pueden afectar o inhibir el desarrollo. Así, tenemos que existen en el mercado tres calidades de agar utilizados para cultivo de tejidos. El tipo I (Gelrite^{MR} o agar purificado), se utiliza a una concentración de 0.2% y los tipos II y III (Bactoagar y agar noble) de 0.8-1.0% (11,12,24,39).

2.2.2.2. Influencia del pH.

El pH influye en la permeabilidad de la membrana celular; por lo tanto, su ajuste tiene como objetivo mantener un alto índice de asimilación de nutrientes contenidos en el medio de cultivo (11,53). El ajuste del pH del medio es concomitante con las características físicas del mismo; por regla general, para las formulaciones líquidas el pH debe ajustarse de 4.8-5.5 y para las sólidas de 5.5-6.4 (11,24,37). Sin embargo, el valor de pH y la forma de ajustarse puede afectar las propiedades físicas y nutritivas del medio, ya que a pH's bajos la solidificación del agar puede ser un problema y a pH's altos puede ocurrir precipitación de algunos nutrientes. El ajuste del pH del medio al momento de su preparación se hace utilizando soluciones diluídas de HCl y NaOH 1.0 N para bajarlo o subirlo, respectivamente (11,12,24).

2.2.2.3. Cantidad de Medio, Volúmen de los Recipientes y Esterilización.

Para obtener una máxima frecuencia de sobrevivencia y desarrollo de los cultivos, debe considerarse el balance entre la masa y/o número de explantes, la cantidad de medio y el volúmen del recipiente. Así, la cantidad de medio de cultivo adicionado a los recipientes tiene que ser directamente proporcional con el tamaño y número de explantes. Por lo general, se agregan de 25-35 ml de medio por cada recipiente (11,12,39). La forma y volúmen del recipiente es importante ya que se han encontrado diferentes respuestas morfogénicas correlacionadas con la ausencia de gradientes por acumulación de CO₂ y etileno cuando se utilizan cajas petri (53). Por regla general, el recipiente debe ser lo suficientemente grande de acuerdo al tipo de crecimiento de la especie y del tiempo que va a permanecer desarrollándose el explante *in vitro*.

Después de preparados los medios de cultivo, el siguiente paso es la esterilización de los mismos. El método más empleado para dicho fin es por medio del calor húmedo, a través de una autoclave a una presión de 1.0 kg/cm^2 (15.0 lb/pulg^2) equivalente a una temperatura de 121°C , por un período de tiempo de 15-20 minutos (12).

2.2.3. Control del Ambiente de Cultivo.

El crecimiento o desarrollo de los cultivos *in vitro* depende también del tipo de ambiente de cultivo a que están sujetos. La intensidad, tipo y duración de la luz, temperatura y la proporción O_2/CO_2 /etileno, juegan un papel importante en la morfogénesis (5,50).

2.2.3.1. Efecto de la Luz.

En teoría, las células, tejidos y órganos cultivados *in vitro*; no realizan la fotosíntesis a una intensidad normal por la interrupción del intercambio de CO_2 ; sin embargo, disponen de una fuente de energía que es el azúcar presente en el medio. La tasa fotosintética va a depender del tipo y tamaño del explante utilizado. Analizando los casos extremos; un brote apical relativamente grande, es más fotosintético que un cultivo de callo y; dentro del mismo callo, uno pigmentado será más fotosintético que el que no lo está. De lo anterior se puede concluir que aunque la luz no sea indispensable para la fotosíntesis; en éste caso si es necesaria para estimular ciertos procesos morfogénicos y también para la formación de clorofila. La activación de los pigmentos fotosintéticos; clorofila A y clorofila B, ocurre a una absorbancia que va de la región azul al rojo del espectro, encontrándose que entre dichas regiones se aumenta la morfogénesis (26,27,50).

Thorpe y Murashige (37) citados por éste último, consideran que la luz es un factor determinante para la acumulación de almidón. Observaron que una acumulación importante de almidón precede a la formación de brotes en cultivos de callo de tabaco; la acumulación ocurre tanto en la luz como en la obscuridad, pero es mayor en la luz. Thorpe y Meier citados por Hughes (26) sugirieron que el almidón puede ser la fuente de energía en el proceso de formación de brotes.

Para cubrir los requerimientos de luz, se utilizan lámparas de luz blanca fluorescente con intensidades que varían de 1000-5000 lux (1,27,37). Murashige (37) considera que las plantas con requerimientos de fotoperíodo normal, pueden manifestar éstas necesidades *in vitro*, siendo necesario un período de obscuridad para la diferenciación de órganos. Se ha hecho costumbre mantener los cultivos con un fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs obscuridad para la inducción de brotes y raíces adventicias; sin embargo, se tienen que considerar las variaciones de intensidad, fotoperíodo y temperatura para cubrir los requerimientos específicos de especies con períodos de quiescencia y dormancia (ej. árboles caducifolios, cultivos bianuales, etc.).

2.2.3.2. Efecto de la Temperatura.

La temperatura controla los procesos de crecimiento y desarrollo celular; influye en las necesidades nutricionales del material vegetal tanto *in vivo* como *in vitro*, manteniendo las actividades metabólicas a un nivel normal. El intervalo de temperatura en el cual las plantas se desarrollan normalmente, varía con la especie y genotipo. Sin embargo, para el cultivo *in vitro*, la temperatura en el cuarto de crecimiento se mantiene a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; no obstante, se tiene que tomar en cuenta los requerimientos estacionales de algunas especies, donde puede suceder que la temperatura

anterior no sea la óptima para la morfogénesis, por lo cual deberán buscarse las variaciones de temperatura diurnas, nocturnas y pre-tratamientos con bajas temperaturas (8-15 °C) a las plantas madre antes de extraer y cultivar los explantes (26,27,37).

2.2.3.3. Proporción O₂/CO₂/etileno.

En estudios realizados al respecto, se ha observado que el control de la morfogénesis es afectado por los diferentes gradientes en la atmósfera que rodea al explante (53). Las cantidades de estos elementos varían considerablemente con el estadio de desarrollo, los reguladores de crecimiento y de la especie estudiada. Dalton y Street citados por Hughes (26), examinaron el efecto de diferentes selladores sobre la acumulación de oxígeno, dióxido de carbono y etileno en cultivos de espinaca. Determinaron que al sellar los recipientes con una película de polietileno se promueve una gran resistencia a la difusión de estos gases en comparación con los sellados con papel o aluminio. Observaron también una reducción en el crecimiento en los matraces sellados con polietileno; debido aparentemente, a la acumulación de dióxido de carbono y etileno. Posteriormente observaron que el dióxido de carbono reduce el crecimiento pero aumenta la pigmentación verde de los tejidos en ausencia del etileno, encontrándose que éste último; además de retardar el crecimiento, promueve la oxidación de los tejidos.

2.2.4. Elección del Explante.

El término explante es utilizado para describir la pieza inicial introducida *in vitro* (43,50). Prácticamente; cualquier parte de la planta puede utilizarse como explante y ser cultivada para regenerar plántulas; sin embargo, la elección va a depender de la especie que será propagada, de los objetivos que se persiguen y del modelo de regeneración a

utilizar (5,27,31,50).

Murashige (37) identificó los factores que deben ser considerados para la elección del explante, siendo estos: 1) el órgano que va a servir como fuente de tejido, 2) el estadio fisiológico u ontogénico del órgano, 3) la época en la cual el explante es obtenido, 4) el tamaño del explante y 5) todas las características de la planta de la cual los explantes serán obtenidos. George y Sherrington citados por Brown y Thorpe (5) añadieron cuatro factores más, el genotipo, orientación del explante, pre-tratamientos e inoculación.

En la propagación clonal a través del cultivo de tejidos; la estabilidad genética puede lograrse por medio de la multiplicación de brotes, yemas, meristemos apicales y axilares originados directamente del explante cultivado, evitando el desarrollo de callo (7,15,27,31,50). Por otro lado, entre más pequeño sea el explante, es más dependiente del medio de cultivo y de los factores ambientales para poder sobrevivir; sin embargo, la eliminación de microorganismos y la probabilidad de obtener plantas regeneradas libres de enfermedades es inversamente proporcional a su tamaño (15,23,37).

2.2.5. Desinfestación del Explante.

Después de la elección del explante, el proceso de desinfestación es el paso siguiente para eliminar microorganismos contaminantes externos e internos (23,31,50).

El desinfestante más utilizado para la desinfestación superficial es el hipoclorito de sodio (NaOCl), encontrándose comunmente a una concentración de 5-6% en los blanqueadores comerciales (cloralex^{MR}, clorox^{MR}). Los explantes son remojados en una solución al 10-15% ^v/_v de blanqueador

(0.5-0.75% de NaOCl) durante un tiempo de 5-15 minutos. La concentración y duración del remojo puede reducirse o incrementarse de acuerdo a las necesidades, teniendo presente que a altas concentraciones puede ocurrir el deterioro de los tejidos y la muerte celular. Para aumentar la humectabilidad; a la solución desinfectante se le agrega Tween 20 (polioxietileno sorbitan monolaurato) al 0.01-0.1%, laurisulfato de sodio al 0.01%, shampoo para bebé 20 gotas/L o cualquier otro agente humectante. La eficacia de la mezcla desinfectante aumenta sometiéndola a agitación y en ocasiones será necesario lavar previamente los explantes con jabón y sumergirlos en etanol 70-75% durante un tiempo de 5-30 segundos antes de remojarlos en la solución de hipoclorito. Para quitar el exceso del desinfectante, es necesario enjuagar los explantes de 3-5 veces con agua destilada estéril antes de ser cultivados *in vitro* (23,27,50).

Los contaminantes internos son difíciles de eliminar; a pesar de las técnicas de desinfección, algunos microorganismos como bacterias e incluso hongos pueden coexistir con los cultivos y pasan desapercibidos durante algunos subcultivos; permaneciendo latentes antes de proliferar, pero que afectan significativamente los índices de multiplicación y otras respuestas organogénicas. Este tipo de contaminación se da especialmente cuando las plantas o genotipos seleccionados para cultivarlos *in vitro*, presentaron problemas de enfermedades sistémicas o infestaciones severas cuando se desarrollaron en el campo. Cuando es así, se deben utilizar otras técnicas de desinfección o agregar antibióticos y fungicidas para lograr una asepsia adecuada del explante.

2.3. Aplicaciones de la Propagación *in vitro*.

Las técnicas utilizadas en la propagación *in vitro* han tomado gran interés e importancia en los últimos años;

pasando de los estudios botánicos y fisiológicos a una aplicación práctica, participando de una manera directa o indirecta en algunas actividades comerciales.

Las investigaciones realizadas en éste campo, aparte de la propagación comercial de ornamentales, se han centrado en las Familias de las gramíneas y leguminosas, por ser en donde se encuentran los cultivos alimenticios más importantes. Estas investigaciones se han realizado como alternativa para solucionar el problema de la escasez de alimentos; buscando resistencia o tolerancia de éstas especies a las alteraciones del espectro infectivo de los patógenos, entre otros factores que afectan su rendimiento (9,44).

La aplicación potencial de la propagación *in vitro* a corto, mediano y largo plazo, puede ser aplicable en las siguientes áreas:

2.3.1. Rápida Propagación Clonal.

Hasta la fecha, el éxito logrado en la multiplicación clonal ha sido en especies propagadas por métodos asexuales. Con excepción de algunos cultivos de importancia agronómica (caña de azúcar, papa, espárrago, fresa, etc.) no se ha aplicado a los demás cultivos debido; principalmente, a que la mayoría son propagados por semilla. Por el momento, la propagación masiva *in vitro* no tiene aplicación para estos cultivos; sin embargo, puede auxiliarse de ésta técnica para obtener variabilidad y utilizarla posteriormente para producir variedades sobresalientes de alto rendimiento (7,44).

Al encontrar los requerimientos específicos de cada especie, los métodos *in vitro* presentan numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación asexual. Por medio de la propagación *in vitro*, se pueden obtener 1) altos

índices de multiplicación (No. de plantas/explante/año) utilizándose menos cantidad de material vegetativo, 2) una aceptable estabilidad genética de los materiales propagados, reduciendo el espacio individual para mantener un lote de plantas madre y 3) una mejor sanidad de las plantas al trabajar en condiciones asépticas combinando esto, con algunos métodos de eliminación de patógenos (23).

En la actualidad, ya se tiene estandarizada la metodología para propagar algunas especies (principalmente ornamentales) por medio del cultivo de tejidos. Existen laboratorios o "Biofábricas" que las producen a escala industrial, distribuyéndolas en el mercado en recipientes; ya sea de plástico o de vidrio, que contienen la planta completa todavía en el medio de cultivo y lista para ser transplantada al suelo.

2.3.2. Eliminación de Enfermedades.

El uso de partes pequeñas de plantas y el empleo de procedimientos asépticos aumentan la probabilidad de obtener material libre de hongos y bacterias; sin embargo, las enfermedades virosas son las más difíciles de eliminar por métodos convencionales. Cuando una planta infectada es propagada vegetativamente; la transmisión del virus se lleva a cabo de generación en generación; donde la población entera de una determinada variedad clonal puede infectarse en unos cuantos años, especialmente con la presencia de virus latentes, cuyos síntomas son difíciles de detectar. La aplicación práctica de éste método es cuando los agricultores que utilizan semilla certificada de papa, dudan de su sanidad con respecto a la presencia de éste tipo de virus. Al estudiar las interacciones hospedero-patógeno *in vitro*, se ha encontrado que con la técnica del cultivo de meristemas apicales; y en algunas ocasiones en combinación con tratamientos de termoterapia y quimioterapia, pueden

obtenerse plantas libres de virus con resultados más confiables comparados con los que se pudieran obtener si se utilizaran cada uno de estos métodos por separado.

El meristemo o domo apical, es aquel tejido localizado en la región subdistal meristemática con unos pocos primordios foliares (23) o bien, todo tejido localizado en la región distal del brote apical junto con el primordio foliar más joven (36). La diferencia entre éstas definiciones estriba en la importancia de los primordios foliares; el primero considera que la capacidad de desarrollo del domo apical depende del número de primordios foliares subyacentes (generalmente dos) junto con los tejidos del tallo, debido a que son fuente de hormonas endógenas. El segundo señala la importancia de aislar sólo el domo apical para reducir la probabilidad de infección por virus.

2.3.3. El Mejoramiento Genético de los Cultivos.

El cultivo de tejidos vegetales en combinación con la Ingeniería Genética, han brindado un gran apoyo al mejoramiento de plantas, dando asistencia directa o indirecta a los agricultores a través de la producción de variedades con características exigidas por el mercado.

Para poder ofrecer a los agricultores una nueva variedad mejorada, se pueden seguir diferentes caminos y; en muchos casos, la combinación de varios de ellos.

2.3.3.1. Selección Directa *in vitro*.

Se tiene la posibilidad de hacer selección directa de nuevos fenotipos de desarrollo uniforme, ciclo de vida corto, etc. bajo condiciones definidas de crecimiento. Millones de células; cada una representando una planta potencial, pueden cultivarse en recipientes incorporándole compuestos tóxicos

inhibidores del crecimiento al medio de cultivo. Las células que logren desarrollarse tendrán cierto grado de resistencia y de éstas células aisladas, pueden regenerarse plantas completas (7).

La resistencia a enfermedades fue la primera característica agronómica de interés que se estudió en éste campo; para lo cual la finalidad de la selección a nivel celular es lograr la heredabilidad y expresión de ésta característica en las plantas de las siguientes generaciones, ya bajo condiciones normales de campo y de manejo. Al seleccionar la resistencia a enfermedades, las células son colocadas en un medio que contiene la concentración letal de la toxina que produce el patógeno (7,15).

Otras características agronómicas de importancia que pueden estar sujetas a selección por ésta técnica son: la tolerancia a metales pesados, sales, sequía, herbicidas, pH's extremos, que son muy accesibles para investigarlos *in vitro*. El problema de la selección *in vitro* es la capacidad para detectar éstas características a un nivel satisfactorio y que sean heredadas a la progenie (7,15,38,48).

2.3.3.2. Hibridación y Cultivo de Protoplastos.

La generación de haploides y heterocigotos a través del cultivo de tejidos dentro de los programas de mejoramiento, facilitará la hibridación interespecífica; principalmente en aquellas especies de autopolinización, carentes de androesterilidad citoplásmica y genético-citoplásmica (7,15,22,23,38). La producción de haploides y heterocigotos puede hacerse a través de la selección de mutantes o cambios genéticos para androesterilidad y por medio del cultivo de embriones, óvulos, ovarios, anteras y granos de polen; tomándose dos caminos: la generación de plantas haploides *in vitro* para luego realizar cruzamientos en condiciones de

campo o realizar la fertilización *in vitro* (7,8,14,15,38,44).

Por otro lado; la Ingeniería Genética aplicada a la agricultura, puede ser utilizada como medio de manipulación genética o fisiológica, generalmente a nivel celular o subcelular para apoyar los programas de mejoramiento. Las herramientas y procedimientos generales de la Ingeniería Genética son: el aislamiento de genes portadores de las características de interés, la clonación de las células en donde se va a insertar la información y el transmisor (*Agrobacterium tumefaciens*) que transmite ésta información (22,51). Sin embargo; al utilizar microorganismos como transmisores, se presentan algunos problemas; ya que con ésta técnica, sólo se obtiene éxito con plantas dicotiledoneas y no con monocotiledoneas. Por lo tanto, se tiene la necesidad de buscar otras alternativas para superar éste problema, llegando a la conclusión de que los métodos físicos como son: el uso de micropipeta, laser, electroporación y pistola de genes, son muy confiables puesto que se han obtenido muy buenos resultados.

De la misma manera, el mejoramiento de plantas a través del aislamiento, fusión y regeneración de protoplastos, aumenta la posibilidad de la hibridación somática en especies incompatibles. La fusión de protoplastos ofrece un mecanismo de cruza interespecíficas e intergenéricas para producir especies transgénicas; transfiriendo resistencia a plagas y enfermedades, androesterilidad, características morfológicas para adaptación, etc. (8,15,22,24,27,38).

Hasta ahora; se han logrado pocos avances al respecto, especialmente en los cultivos alimenticios por la dificultad de aislar y regenerar plantas a través de protoplastos, también por la incapacidad para seleccionar híbridos somáticos de tipos parentales. Sin embargo, la contribución más importante de la Ingeniería Genética es haber aclarado

todavía más la función de los genes de las plantas superiores, evaluando su participación en las características genotípicas y fenotípicas, así como también las consecuencias o resultados al insertar determinados genes en un genomio de una planta (9,12).

2.3.4. Preservación de Germoplasma.

El método más común de conservación y preservación de germoplasma es por medio de semilla debido a sus múltiples ventajas; entre ellas, su bajo contenido de humedad y baja actividad metabólica, características que le permiten sobrevivir a bajas temperaturas por largos períodos. Así mismo; se pueden preservar *in vitro* las mismas especies sin afectar su capacidad para volver a regenerarse en una planta completa (23).

El objetivo de la preservación de germoplasma *in vitro* es mantener los cultivos bajo condiciones de mínimo crecimiento para que en un momento dado estén disponibles como fuente de variabilidad. Así, por medio de bajas temperaturas y poca cantidad de medio de cultivo se logra disminuir el índice metabólico. Las plantas regeneradas y libres de enfermedades; así como las variedades sobresalientes, pueden preservarse a bajas temperaturas (23).

Durante los últimos años se ha tomado un gran interés el hecho de poder preservar meristemos o yemas vegetativas a temperaturas criogénicas (nitrógeno líquido a -196°C). A ésta temperatura, las actividades metabólicas de las células son totalmente suspendidas, postulándose de que estos meristemos podrán preservarse indefinidamente. Se tienen algunos ejemplos de la criopreservación en cultivos como: peral, manzano, fresa, papa, clavel, etc.

2.3.5. Obtención de Productos Químicos.

Siempre ha existido un interés por la búsqueda de nuevas especies de plantas que sean de beneficio para hombre. En la actualidad, gran cantidad de productos de origen vegetal son empleados en diferentes campos de la Medicina, Agricultura e Industria. Estos productos químicos naturales (metabolitos secundarios) incluyen alcaloides, aceites esenciales, pigmentos, etc., muchos de los cuales se obtienen de extractos vegetales. La acumulación de estos metabolitos secundarios es un proceso de diferenciación y especialización de las células, donde por medio de la industrialización se pueden elaborar con ellos; alimentos, farmacéuticos, esencias, pesticidas, etc.

Desafortunadamente, la gran mayoría de las especies potenciales y utilizadas para dicho fin, son plantas silvestres no cultivadas que pueden estar en peligro de extinción al explotarse intensivamente. La propagación a través del cultivo de tejidos, atenuará la explotación excesiva e inmoderada de los recursos naturales, ya que sólo será necesario establecer y mantener un lote de plantas madre que servirá como fuente de explantes.

2.3.6. Estudios Fisiológicos.

Para el estudio de procesos fisiológicos en plantas completas, no es posible aislar factores específicos que afectan el desarrollo vegetal; por lo tanto, el aislamiento de partes de tejido especializado y cultivados *in vitro*, proporciona un sistema simplificado inafectable, sin correlación con otras partes de la planta y factores ambientales indeseados. Esta técnica ofrece una metodología para estudiar el control del crecimiento, dormancia, ciclos reproductivos, balance hormonal, brotación, fotosíntesis, requerimientos nutricionales específicos y esenciales que

afectan la calidad alimenticia de los cultivos (23).

2.4. Perspectivas Futuras.

Es importante continuar con las investigaciones sobre la propagación *in vitro* de especies útiles para el hombre; principalmente para su alimentación, encontrar sus requerimientos nutricionales para propagarlos clonalmente, inducir o seleccionar variabilidad para de ésta forma aumentar la productividad en el campo. Es necesario también; incrementar la eficiencia de la multiplicación *in vitro*, controlando los factores que afectan al sistema de regeneración. Algunos conceptos que se consideran importantes para ésta finalidad son los referidos al fenómeno de "Habitación" (19) y "Cultivos Fotosintéticos" (22).

La habitación se refiere a todos los cambios que conllevan a la independencia de los requerimientos nutricionales de los tejidos y órganos cultivados, especialmente de los reguladores de crecimiento (12,20,46,53). Skirvin (46), considera que la habitación puede detectarse por medio de diferentes procedimientos: 1) continuación de un largo período de cultivo de las plantas, 2) disminución progresiva de las cantidades de auxinas del medio y 3) aislamiento de callo de tumores de plantas infectadas por virus o bacterias; notándose un incremento en el índice de crecimiento y multiplicación. Sin embargo; la habitación, además de presentar diferentes grados, es reversible; es decir, plantas derivadas de células totipotentes habituadas producirán callo *in vitro* sólo con la presencia de hormonas; lo que hace suponer que probablemente se presentan cambios en la expresión del gene (cambios epigenéticos) y no de origen mutacional (7,15,46,53).

El concepto de cultivos fotosintéticos implica cambiar del estado heterotrófico de los cultivos *in vitro* al

fotoautotrófico que para ser considerado como tal; en el sentido estricto de la palabra, se deben de eliminar del medio sintético todos los factores orgánicos tales como hormonas, vitaminas, azúcares, etc. durante todo el período de cultivo (22,50,53).

El diseño de sistemas de desarrollo fotoautotrófico se basa en dos requerimientos físicos esenciales y uno inherente al propio tejido cultivado. Primero; la luz se requiere de 390-720 nm en la actividad fotosintética. Segundo, una atmósfera conteniendo elevadas cantidades de CO₂ y tercero, que las células estén propensas para el desarrollo fotosintético. Un hecho importante es que la fijación del carbono proveniente del CO₂ es estrictamente dependiente de la luz. Los sistemas de cultivo pueden ser modificados enriqueciéndolos e introduciendo a los recipientes gas CO₂ u otra fuente, en combinación con fotoperíodos donde se eficientice su fijación. Es importante considerar que en algunos casos; el suministro inadecuado de CO₂ y la intervención de inhibidores; producto de la fotorespiración, influyen negativamente en el control de la morfogénesis (22,50,53).

La importancia de la habituación y; principalmente de los cultivos fotosintéticos, radica en la utilidad que tienen en los estudios relacionados con los procesos fisiológicos y la genética vegetal, así como también en la investigación de nuevos herbicidas y reguladores de crecimiento donde; en los medios de cultivo comunes, puede haber posibles complicaciones por la interacción de los químicos ensayados y los componentes del medio de cultivo. Como un gran número de procesos fisiológicos son afectados por la fotosíntesis durante todo el desarrollo; los cultivos fotosintéticos pueden tener mayores ventajas en los programas de mejoramiento, ya que las respuestas encontradas en éste tipo de sistemas, serían similares a las respuestas de una planta

completa; es decir, existe una alta correlación entre las condiciones *in vitro* e *in vivo*.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Materiales.

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal del Laboratorio de Fitopatología y Micología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, iniciando en enero de 1990 y finalizando en septiembre de 1991. El experimento fue financiado por el Proyecto S.E.P.-F.C.B.U.A.N.L.-F.A.U.A.N.L. denominado "Implementación de la técnica de cultivo de tejidos vegetales para evaluar material germplásmico de frijol resistentes a patógenos del suelo".

3.1.1. Material y Equipo.

Se utilizó todo el material de cristalería de uso rutinario en el laboratorio, así como de equipo especial para el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Estos materiales se enlistan en el cuadro 1A.

3.1.2. Reactivos.

Todas las fuentes de sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento utilizados para preparar los medios de cultivo experimentales fueron de grado reactivo, excepto por la fuente de carbono donde se empleó azúcar de mesa refinada o sacarosa. Estos reactivos se enlistan en el cuadro 2A de la preparación de las soluciones concentradas.

3.1.3. Material Biológico.

Para la realización del experimento se utilizaron brotes apicales de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de los genotipos Selección 4, Pinto Norteño, Ciateño y la línea LEF-1-RB. La semilla fue proporcionada por la Unidad de Recursos Genéticos de la F.A.U.A.N.L.

3.1.4. Diseño Experimental.

De los resultados obtenidos durante las cuatro etapas en que se dividió el experimento, sólo se analizó estadísticamente la Etapa I o inducción de brotación utilizándose un diseño completamente al azar con arreglo factorial, existiendo variación en el número de repeticiones debido a la pérdida de algunas de ellas por contaminación.

3.1.5. Modelo Estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + M_j + VM_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

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

μ = Media del experimento.

V_i = Efecto del i -ésimo genotipo.

M_j = Efecto del j -ésimo medio de cultivo.

VM_{ij} = Efecto de la ij -ésima interacción genotipo/medio de cultivo.

E_{ijk} = Error experimental.

$$i = 1, \dots, v = 4$$

$$j = 1, \dots, m = 2$$

$$k = 1, \dots, r = 10$$

$$ijk = vmr = 80 \text{ observaciones.}$$

3.1.6. Descripción de Tratamientos.

FACTOR A: Genotipos = 4	Selección 4
	Pinto Norteño
	Ciateño
	LEF-1-RB

FACTOR B: Medios de cultivo = 2	BI2
	BN3

Quedando los tratamientos de la siguiente manera:

T1 = Selección 4/BI2	T5 = Ciateño/BI2
T2 = Selección 4/BN3	T6 = Ciateño/BN3
T3 = Pinto Norteño/BI2	T7 = LEF-1-RB/BI2
T4 = Pinto Norteño/BN3	T8 = LEF-1-RB/BN3

Cada tratamiento con diez repeticiones originalmente.

Los tratamientos se distribuyeron en tubos de ensaye y estos a su vez en gradillas, considerándose un tubo como repetición. Se colocaron las gradillas/tratamiento aleatoriamente en un sólo estante con la misma iluminación, fotoperíodo y temperatura.

Para la Etapa II o multiplicación de brotes se utilizó el mismo arreglo de tratamientos y repeticiones; pero no se realizó análisis estadístico (las razones se darán posteriormente), mientras que para las Etapas III de enraizamiento y IV de transferencia al suelo, los resultados fueron obvios al realizar las observaciones durante la toma de datos.

Para la Etapa III o de enraizamiento los tratamientos se ordenaron de la manera siguiente:

Genotipos = 4	Selección 4
	Pinto Norteño
	Ciateño
	LEF-1-RB

Medios de cultivo = 4	A
	B
	C
	D

Quedando la siguiente combinación:

T1 = Selección 4/A	T9 = Ciateño/A
T2 = " /B	T10 = " /B
T3 = " /C	T11 = " /C
T4 = " /D	T12 = " /D
T5 = Pinto Norteño/A	T13 = LEF-1-RB/A
T6 = " /B	T14 = " /B
T7 = " /C	T15 = " /C
T8 = " /D	T16 = " /D

cada tratamiento con cinco repeticiones.

3.1.7. Variables Estudiadas.

Desarrollo de callo basal:

Para la medición de ésta variable se estableció una escala cualitativa, valorándose como sigue:

- 0 = ninguno
- 1 = poco (menos de 1.0 cm de diámetro)
- 2 = medio (1.0 a 1.5 cm de diámetro)
- 3 = abundante (1.5 a 2.5 cm de diámetro)

Número de brotes por explante:

Se tomaron en cuenta todos los brotes desarrollados a partir del explante cultivado.

Longitud de los brotes:

La longitud (en mm) se tomó desde de la base del tallo hasta el punto de crecimiento, ignorando la formación de callo basal.

Longitud de raíces:

La medición se realizó en la raíz principal anotando también, algunas características de interés.

3.2. Métodos.

3.2.1. Técnicas y Procedimiento para el Establecimiento de los cultivos *in vitro*.

3.2.1.1. Preparación de Soluciones Concentradas.

Por lo general, los viveristas utilizan para la propagación *in vitro* de plantas ornamentales, determinados medios de cultivo ya estandarizados, que cubren los requerimientos nutricionales de dichas especies. Para la preparación de los medios, utilizan premezclas comerciales de los componentes y sólo es necesario disolverlas en agua. Sin embargo en investigación; para preparar medios de cultivo experimentales, es necesario suministrar algunos componentes en cantidades muy pequeñas y muy variadas, por lo que antes de hacer los medios de cultivo, es recomendable incluir la preparación de soluciones concentradas, madre o stock. Las soluciones concentradas reducen los pasos en la preparación de medios y minimizan los errores y reacciones indeseadas o de precipitación al momento de mezclar los componentes.

Para la preparación de soluciones concentradas, es indispensable utilizar agua destilada o bidestilada y todos los reactivos puros. En el cuadro 2A se muestran las soluciones concentradas empleadas en éste experimento.

3.2.1.2. Preparación de Medios de Cultivo.

Todos los medios se prepararon a partir de soluciones concentradas, utilizándose como medio básico el propuesto por

Murashige-Skoog (MS básico), constituido por sales minerales (cuadro 1), adicionándole mio-inositol 100 mg/L, tiamina 1.0 mg/L, ácido nicotínico y piridoxina 0.5 mg/L, sacarosa 30 gr/L y Gelrite^{MR} 2 gr/L para solidificar el medio. El pH se ajustó con soluciones de NaOH o HCl 1.0 N a 5.9 para posteriormente esterilizarlo.

Se prepararon dos tipos de medio; estableciendo en cada uno el tipo y la combinación hormonal tentativa para lograr la inducción de brotación, multiplicación y enraizamiento de brotes. Las cantidades de los componentes y la preparación de los medios a partir de las soluciones concentradas se muestran en el cuadro 3A.

En la Etapa I y II de inducción de brotación y multiplicación, respectivamente, se utilizaron dos combinaciones de Benciladenina (BA) con Acido Indolacético (AIA) o Acido Naftalenacético (ANA), quedando de la siguiente manera:

Medio BI2 : MS básico + BA 1.0 mg/L + AIA 0.05 mg/L.

Medio BN3 : MS básico + BA 3.0 mg/L + ANA 0.1 mg/L.

Los medios para enraizamiento consistieron de MS básico, substituyéndose la BA por Cinetina, variando las concentraciones de AIA y ANA, y se incluyó el Acido Indolbutírico (AIB), dando lugar a cuatro medios, los cuales quedaron:

Medio A : MS básico (sin hormonas).

Medio B : MS + Cinetina 0.5 mg/L + AIA 0.3 mg/L.

Medio C : MS + Cinetina 0.5 mg/L + ANA 0.6 mg/L.

Medio D : MS + Cinetina 0.5 mg/L + AIB 3.0 mg/L.

La cantidad de medio utilizada en las tres etapas fue de 25 ml por recipiente, fuese tubo de ensaye o frasco Gerber^{MR}.

Los tubos y frascos ya tapados se esterilizaron en una olla de presión a 1.0 kg/cm^2 a 121°C durante 15 minutos. En el caso de los tubos; para tener una mayor superficie de contacto de los explantes con el medio de cultivo y antes de que se solidificara el agar, estos se inclinaron en gradillas a 45° .

3.2.1.3. Desinfestación y Siembra de Semilla.

La finalidad de la desinfestación de la semilla es disminuir la cantidad de microorganismos contaminantes que pueda tener debido a su desarrollo en condiciones de campo, y evitar de ésta manera, que estos sean llevados hasta la fase de cultivo *in vitro*.

Antes de realizar la desinfestación; la mesa de trabajo se limpió y desinfestó con alcohol al 70%, todo el material de cristalería y pinzas fue esterilizado en olla de presión. Las semillas de los genotipos Selección 4, Pinto Norteño, Ciateño y la línea LEF-1-RB, se desinfestaron en una solución de Cloralex^{MR} al 10% (0.5% de NaOCl) V/v más 20 gotas/L de Tween 20 como agente humectante-dispersante por un período de 10 minutos y posteriormente enjuagadas tres veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos del desinfestante.

Inmediatamente después de desinfestadas las semillas; éstas fueron sembradas en charolas de propagación que contenían perlita estéril, colocándose la suficiente semilla para asegurar una cantidad adecuada de plántulas. Los riegos se realizaron con agua destilada cuando se requería hasta obtener plántulas de la edad y tamaño adecuado.

En la figura 1 se esquematiza el diagrama de flujo que se siguió para establecer el experimento.

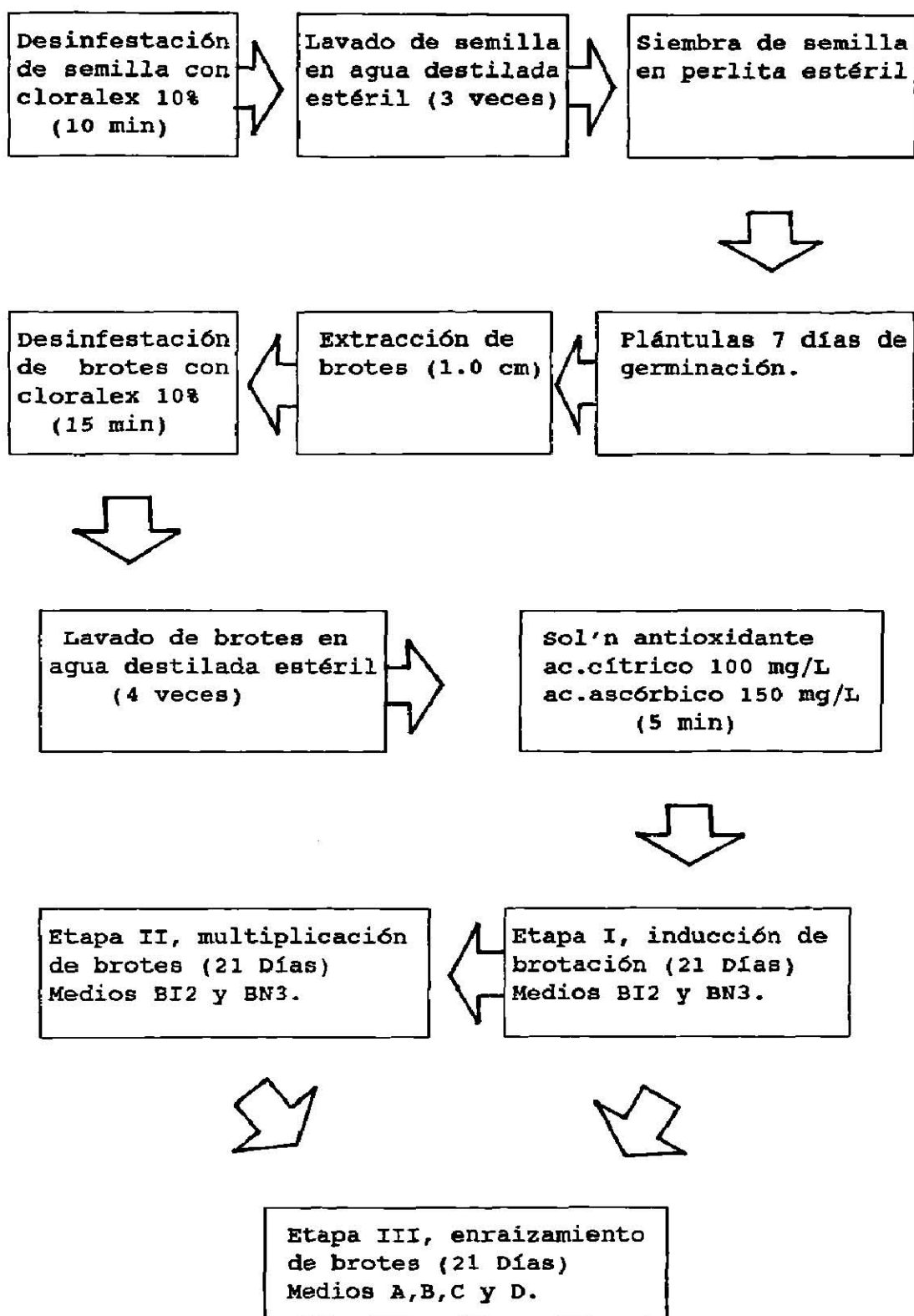


Figura 1. Diagrama de flujo mostrando la metodología utilizada en el experimento.

3.2.1.4. Extracción de Explantes.

El explante utilizado en el experimento fue el brote apical de plántulas con siete días de germinación, cuando éstas presentaban las hojas simples totalmente desplegadas. Las plántulas fueron decapitadas auxiliándose para esto de un bisturí; eliminando las hojas con pecíolo, dejándose a una longitud final de 1.0 cm. Los brotes se colocaron en cajas petri para evitar que perdieran humedad, hasta el momento de ser cultivados.

considerando las cuatro etapas propuestas por Murashige (37) para la propagación *in vitro*, el experimento se dividió de la siguiente manera:

3.2.1.5. Etapa I: Inducción de Brotación.

El experimento inicial consistió en cultivar los explantes en los medios BI2 y BN3 para inducir brotación. En ésta etapa y en las siguientes; todas las actividades se realizaron en la cámara de flujo laminar, en donde se trabajó con asepsia total, desinfectando la cámara con alcohol al 70%, y estando estéril todo el material de cristalería que se introdujera en ella. Se empleó un mechero con alcohol para flamear pinzas y bisturí.

Los explantes fueron colocados en una gasa para facilitar su manejo al someterlos a desinfección. Esta se realizó en una solución semejante a la utilizada en la desinfección de semilla pero ésta vez los explantes se dejaron sumergidos durante 15 minutos, fueron enjuagados cuatro veces con agua destilada estéril e inmediatamente se transfirieron a una solución antióxidante compuesta por ácido cítrico 150 mg/L y ácido ascórbico 100 mg/L por un tiempo de 5 minutos para posteriormente secarlos con papel filtro para quitarles el exceso de humedad antes de ser colocados en los

medios de cultivo.

Se colocaron dos explantes de cada uno de los genotipos por tubo de ensaye, tratando de que el explante quedara enterrado un poco en el medio de cultivo. Los tubos con los explantes fueron tapados, sellados con una película de plástico o polietileno (Kleen Pack^{MR}) y colocados en el cuarto de incubación en estantes con lámparas fluorescentes de luz blanca a 3000 lux, un fotoperíodo de 16 hr luz/8 hr oscuridad y a una temperatura de 25 ± 1 °C.

3.2.1.6. Etapa II: Multiplicación de Brotes.

El objetivo de ésta etapa fue aumentar el número de brotes por explante. Para esto, se recultivaron el 50% de los brotes obtenidos en la Etapa I después de 21 días de establecidos. Todos los brotes se transfirieron directamente a medios BI2 y BN3; sin embargo, los brotes que tenían la longitud adecuada (que fueron muy pocos) se subdividieron para ser transferidos individualmente. Se trató de homogenizar el tamaño de todos los brotes eliminando callo basal y las partes oxidadas que pudieran afectar su posterior desarrollo. En ésta ocasión el medio se virtió en frascos Gerber^{MR} para tener un mayor espacio de crecimiento, colocándose de 3-4 brotes por frasco y se llevaron al cuarto de incubación con las mismas condiciones de fotoperíodo y temperatura que la etapa anterior.

3.2.1.7. Etapa III: Enraizamiento de los Brotes.

Se realizó un bioensayo con el restante 50% de los brotes de la Etapa I para enraizarlos en los medios A, B, C y D. Al igual que en la Etapa II; los brotes se transfirieron directamente o subdividiendo los brotes adecuados para ser subcultivados, eliminando callo y oxidación. En ésta etapa del experimento, se colocó un brote por cada tubo de ensaye.

Los brotes obtenidos en la Etapa II después de 21 días de cultivados; se transfirieron a medio D (que fue el que mostró los mejores resultados) para su enraizamiento. Debido a la alta proliferación de brotes; pero no con la longitud adecuada, se optó por subdividir la masa de brotes en grupos de 3-4, eliminando la nueva formación de callo y partes oxidadas antes de colocarlos en el medio de cultivo para enraizamiento y así evaluar su comportamiento bajo las mismas condiciones de ambiente de cultivo.

3.2.1.8. Etapa IV: Aclimatación de Plántulas Regeneradas y su Transferencia al Suelo.

En ésta última etapa de la micropropagación realizada *in vivo*, sólo se consideró para observar el comportamiento general de las plántulas regeneradas *in vitro*, puesto que no estaba contemplada dentro de los objetivos de la investigación. En ésta etapa, el objetivo es darle un cierto grado de tolerancia a las plántulas al pasar de una etapa a la otra; tratando de mantener la asepsia. Del tubo de ensaye se transfirieron a recipientes (vasos de plástico o hielo seco) que contenían una mezcla estéril de suelo y perlita en una proporción de 2:1 y después de colocadas las plántulas, el recipiente se tapó con una bolsa de plástico transparente.

Las macetitas se colocaron en las mismas condiciones de cultivo: 25 °C, con un fotoperíodo de 16 hr luz/8 hr oscuridad a 3000 lux, dándose riegos con agua destilada estéril cada que se necesitaba. A partir del octavo día después de colocadas las bolsas de plástico, se les hacía un orificio cada semana hasta completar el tiempo necesario para que sobreviviera por si sólo la planta y posteriormente desarrollarse en condiciones normales.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Resultados.

4.1.1. Etapa I: Inducción de Brotación.

A los cuatro días de cultivados los explantes en los medios de cultivo para brotación, hubo un hinchamiento del hipocotilo alcanzando hasta cuatro veces su diámetro original; a partir de aquí se comenzó a desarrollar callo basal y a crecer tanto el ápice como las yemas laterales. Para el quinto día se manifestó un 15% de contaminación provocada por bacterias sistémicas o probablemente por fallas en el método de desinfestación y manipulación de los explantes.

Las variables consideradas en ésta etapa fueron: desarrollo de callo basal, número de brotes por explante y longitud de los mismos después de 21 días de establecidos, tomándose lecturas cada siete días para seguir el comportamiento morfogénico de los cultivos.

A los siete días de cultivados los explantes, en el 26% de las observaciones se había formado callo; mientras que el 100% de los explantes ya tenían brotes laterales, promediando 1.5 brotes por explante y una longitud de 4.0-15.7 mm en los brotes laterales y apicales, respectivamente. En general; se observó poco aumento en la longitud de los brotes, así como del número de brotes por explante; teniendo una longitud promedio final de 15.37-17.14 mm y 2.0-2.5 brotes por explante respectivamente, en los cuatro genotipos después de 21 días de establecidos (figuras 2, 3 y 7); debido posiblemente, a que en las repeticiones en donde aumentó el número de brotes por explante, la longitud promedio del brote apical se mantuvo constante y cuando no cambió el número de brotes con respecto a la lectura anterior, la longitud individual de los brotes aumentó. En éste tiempo, el 100% de

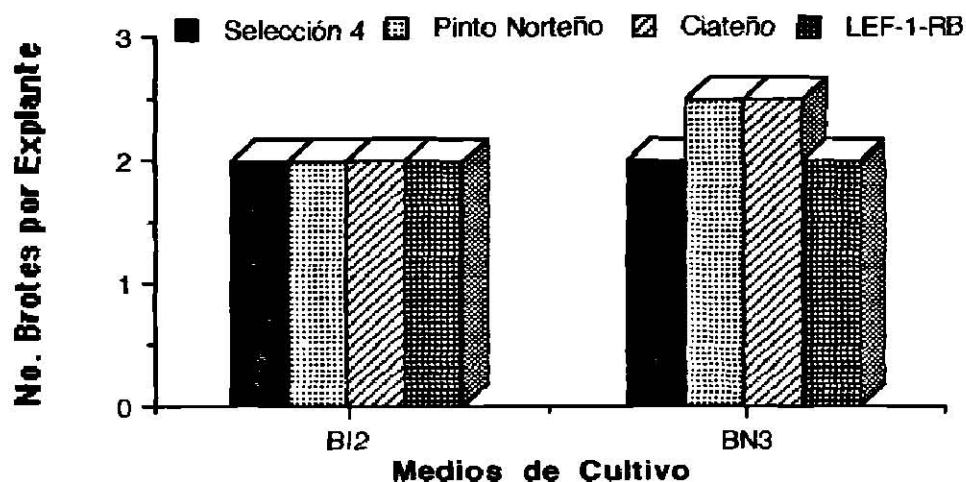


Figura 2. Número de brotes por explante obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.

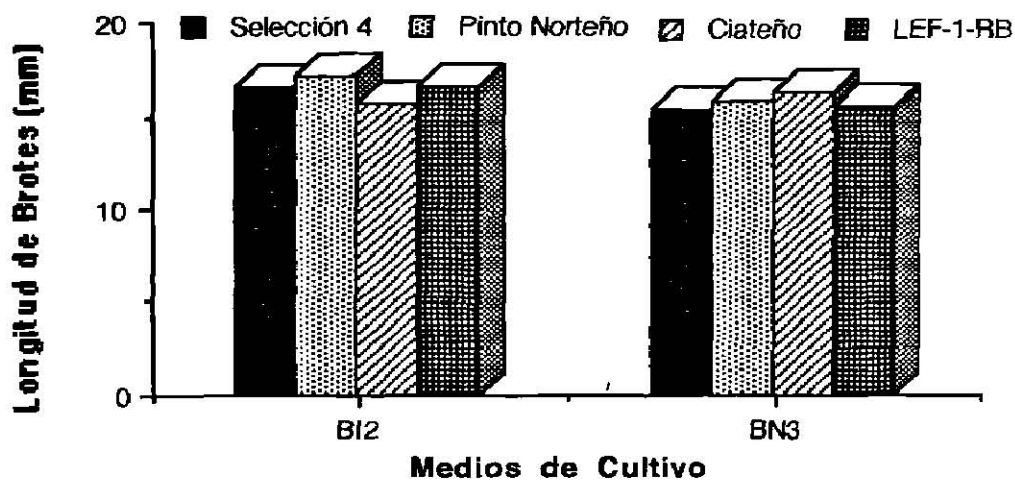


Figura 3. Longitud de los brotes obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.

los explantes ya habían formado callo basal.

Para el análisis estadístico de las variables desarrollo de callo basal y número de brotes por explante, fue necesario transformar los datos utilizando \sqrt{x} . En los cuadros 5, 6 y 7, se presentan los análisis de varianza para cada una de las variables estudiadas en ésta etapa.

Cuadro 5. Análisis de Varianza para la variable desarrollo de callo basal en los brotes apicales de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
Genotipos	3	2.049	0.683	2.511	0.065 ^{NS}
Medios de C.	1	0.173	0.173	0.636	0.428 ^{NS}
Interacción	3	0.876	0.292	1.073	0.366 ^{NS}
Error	72	19.592	0.272		
Total	79	22.691	0.287		

NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

^{NS} NO SIGNIFICATIVO.

Cuadro 6. Análisis de Varianza para la variable número de brotes por explante producidos por los brotes apicales de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F	P>F
Genotipos	3	1.169	0.390	1.695	0.176 ^{NS}
Medios de C.	1	0.075	0.075	0.326	0.570 ^{NS}
Interacción	3	0.589	0.196	0.854	0.469 ^{NS}
Error	72	16.561	0.230		
Total	79	18.395	0.233		

NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

^{NS} NO SIGNIFICATIVO.

Cuadro 7. Análisis de Varianza para la variable longitud de los brotes (mm) producidos por los brotes apicales de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
Genotipos	3	223.060	74.353	2.282	0.086 ^{NS}
Medios de C.	1	95.922	95.922	2.945	0.090 ^{NS}
Interacción	3	36.402	12.134	0.372	0.773 ^{NS}
Error	72	2345.448	32.576		
Total	79	2700.832	34.188		

NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

^{NS} NO SIGNIFICATIVO.

Como se puede observar en los cuadros anteriores; no existió diferencia estadística a un nivel de significancia de 0.05 en ninguna de las variables; pero si existió diferencia a un nivel de significancia de 0.06 en la formación de callo

basal entre los diferentes genotipos. En el cuadro 8 y figura 4, se observa que la variedad Ciateño fue la que formó más callo en el medio BN3 y la variedad Selección 4 la que formó menos en el medio BI2. Con respecto al número de brotes por explante; se obtuvo un promedio de 2.0-2.5. También pudo observarse que aunque no se encontró diferencias en la longitud de los brotes, si se encontraron en tamaño y vigor de las hojas que fue; sin lugar a dudas, por las características genotípicas de la variedad.

Cuadro 8. Efecto promedio ocasionado por los medios BI2 y BN3 sobre la inducción de brotación en los explantes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en la Etapa I.

VARIABLES ESTUDIADAS				
GENOTIPOS		Desarrollo de callo basal*	No.brotes por explante.	Longitud (mm)
Selección 4	BI2	1.0	2.0	16.50
	BN3	2.0	2.0	15.37
Pinto Norteño	BI2	2.0	2.0	17.14
	BN3	2.0	2.5	15.85
Ciateño	BI2	2.0	2.0	15.66
	BN3	3.0	2.5	16.28
LEF-1-RB	BI2	2.0	2.0	16.50
	BN3	2.0	2.0	15.50

* 0 = ninguno; 1 = poco; 2 = medio y 3 = abundante.

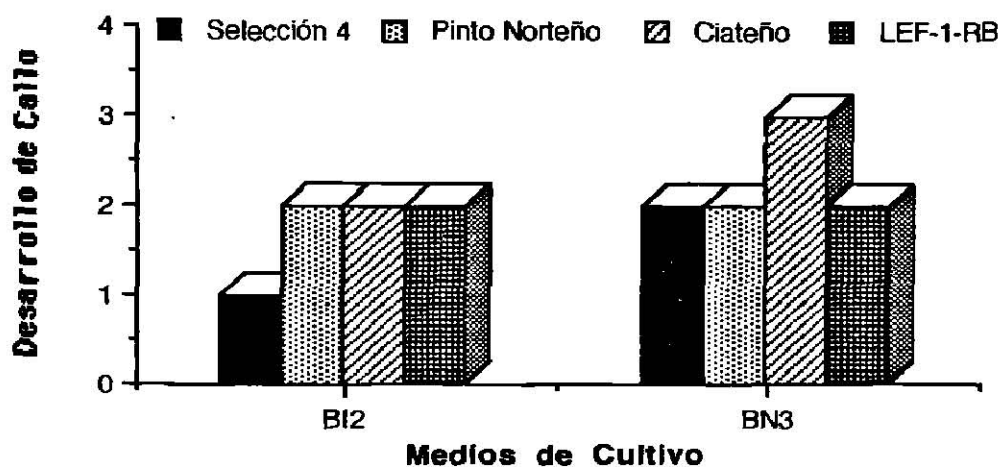


Figura 4. Desarrollo de callo basal en los brotes apicales de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa I.

4.1.2. Etapa II: Multiplicación de Brotes.

Sólamente se tomó una lectura final a los 21 días de recultivados los brotes provenientes de la Etapa I. En ésta parte del experimento; la contaminación ocasionada por bacterias se redujo a un 8%. Así mismo, no se realizó análisis de varianza; ya que algunos de los brotes obtenidos se originaron de callo basal, efecto indeseado en el experimento. En el cuadro 9 se concentran los resultados.

Cuadro 9. Efecto promedio ocasionado por los medios BI2 y BN3 sobre la multiplicación de brotes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de recultivados los brotes obtenidos en la Etapa I.

GENOTIPOS	VARIABLES ESTUDIADAS			
	Desarrollo de callo basal*	No.brotes por explante**	longitud (mm)	
Selección 4	BI2	2.0	10.0	7.21
	BN3	3.0	10.5	7.18
Pinto Norteño	BI2	3.0	15.5	6.35
	BN3	3.0	22.5	5.02
Ciateño	BI2	3.0	14.0	3.45
	BN3	3.0	16.5	4.63
LEF-1-RB	BI2	2.0	11.0	3.11
	BN3	2.0	12.45	3.82

* 0 = ninguno; 1 = poco; 2 = medio y 3 = abundante.

** Incluyendo brotes originados de callo.

Los brotes nuevamente formaron callo basal con un diámetro aún mayor que en la etapa anterior. En lo que se refiere al número de brotes por explante y a la longitud de los mismos, la variedad Pinto Norteño fue la que tuvo mejor comportamiento con 22.5 brotes por explante producidos en en medio BN3 y la que produjo menos fue la variedad Selección 4 con 10.0 brotes por explante en el medio BI2 (figura 5).

Aunque hubo una gran proliferación de brotes; la elongación de los mismos no fue muy significativa (figura 6), dando la apariencia de una masa compacta de yemas y brotes con una longitud promedio de 5.09 mm (figura 8). Debido a ésta situación; se trató de prolongar el período de cultivo para dar tiempo a que se elongaran los brotes y se desarrollaran más las yemas; sin embargo, después de los 15 días de recultivados, se empezó a rediferenciar el callo dando lugar al desarrollo de brotes adventicios al igual que la oxidación del mismo y de todos los tejidos presentes.

4.1.3. Etapa III: Enraizamiento de los Brotes.

En el bioensayo realizado para enraizar los brotes obtenidos en la Etapa I, se presentó un 11% de contaminación bacteriana en todo el bioensayo y un 60% de oxidación; únicamente de los tejidos en la línea LEF-1-RB a los 5 días de recultivada, debido aparentemente, a la poca longitud que tenían (menos de 1.0 cm) a pesar de que se les eliminó a los brotes las partes oxidadas antes de ser recultivados o subcultivados en los medios A, B, C y D.

En el cuadro 10 se puede observar que el desarrollo de callo basal disminuyó considerablemente; del 100% que se presentó en los tratamientos de las Etapas I y II; a un 25-75% y con un diámetro menor en ésta etapa, principalmente en los medios A, B y C. En éste mismo cuadro se observa también que existe una alta correlación entre la producción de callo basal y la formación de raíces; excepto quizá, por la variedad Pinto Norteño cultivada en el medio A o MS básico (sin hormonas) en donde se obtuvo un 20% de enraizamiento, comparado con un 60% obtenido en el medio D, donde si se formó callo.

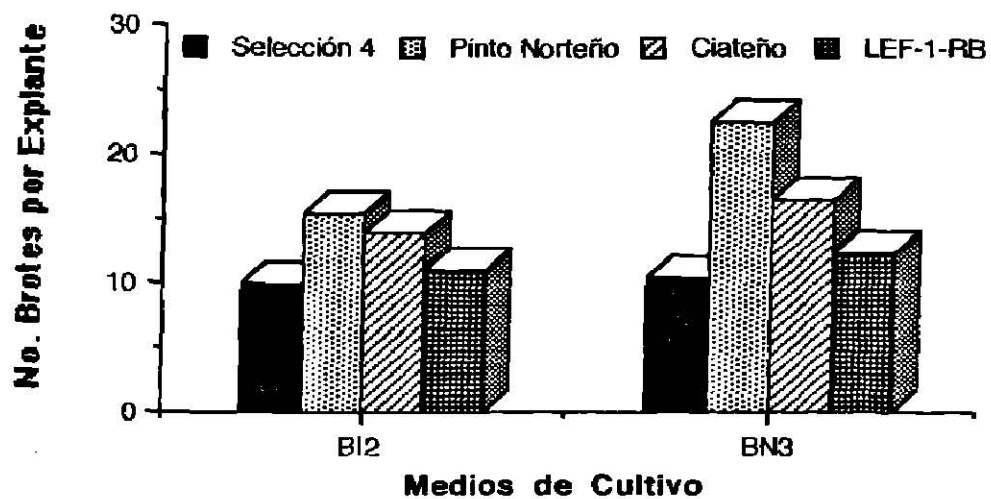


Figura 5. Número de brotes por explante obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa II.

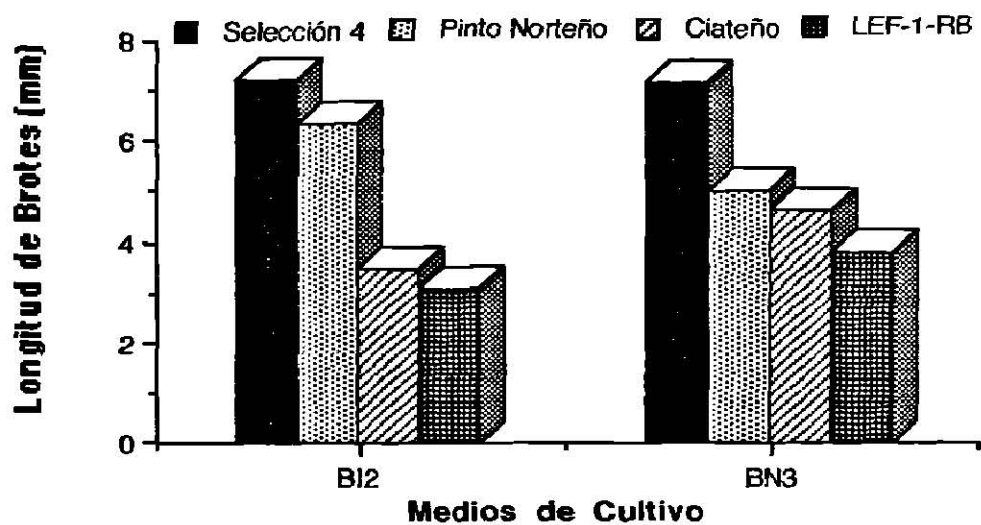


Figura 6. Longitud de los brotes obtenidos de los diferentes genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), después de 21 días de cultivados en los medios BI2 y BN3 de la Etapa II.



Figura 7. Aspecto general de los brotes obtenidos en la Etapa I de la variedad Ciateño a los 14 días de cultivada en el medio BN3. Inducción de brotación y desarrollo de callo en la parte basal del brote.



Figura 8. Masa de brotes obtenidos en la Etapa II de los diferentes genotipos de frijol, con poca longitud, abundante desarrollo de callo y oxidación de tejidos.

Cuadro 10. Efecto promedio ocasionado por los medios A, B, C y D sobre la formación de raíces en los brotes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) obtenidos en la Etapa I, después de 21 días de recultivados.

VARIABLES ESTUDIADAS					
GENOTIPOS		Desarrollo de callo basal*	longitud de brotes (mm)	longitud de raíces (mm)	% R
Selección 4	A	0	10.5	0	0
	B	0	8.5	0	0
	C	1.0	11.4	0	0
	D	0	7.5	0	0
Pinto Norteño	A	0	10.6	30.0	20.0
	B	1.0	10.0	0	0
	C	1.0	5.6	7.0	20.0
	D	2.0	14.5	21.0	60.0
Ciateño	A	0	7.6	0	0
	B	0	10.0	0	0
	C	1.0	8.6	0	0
	D	3.0	10.2	20.0	20.0
LEF-1-RB	A	---	---	---	---
	B	---	---	---	---
	C	1.0	6.3	0	0
	D	2.0	3.8	20.0	20.0

* 0 = ninguno; 1 = poco; 2 = medio y 3 = abundante.

--- Observaciones perdidas por oxidación de tejidos.

En algunas de las observaciones se formaron masas compactas de yemas que no llegaron a desarrollarse y también; de las hojas de los brotes que estaban en contacto con el

medio de cultivo (específicamente el medio D), formaron raíces adventicias. En general; las raíces producidas en todos los tratamientos eran simples al principio, para posteriormente ramificarse dando una apariencia normal, vigorosas y profusas, incluso después de formadas éstas, los brotes se elongaron llegando a alcanzar una longitud de 50 mm después de los 21 días de establecidos en los medios de cultivo; longitud muy apta para transferir las plántulas a suelo (figura 9).

Los brotes o grupos de brotes de los cuatro genotipos obtenidos en la Etapa II; se transfirieron al medio D (por ser el que mostró los mejores resultados) para su enraizamiento. Esta vez se logró controlar la contaminación bacteriana, pues no se presentó. En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos en ésta etapa.

Cuadro 11. Efecto del medio D sobre la formación de raíces en los brotes de los cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) obtenidos en la Etapa II, después de 21 días de subcultivados.

VARIABLES ESTUDIADAS				
GENOTIPOS	Desarrollo de callo basal*	Longitud de brotes (mm)	Longitud de raíces (mm)	% R
Selección 4	1.0	12.3	15.0	40.0
Pinto Norteño	3.0	25.8	32.2	80.0
Ciateño	3.0	14.6	18.0	60.0
LEF-1-RB	1.0	9.1	0	0

* 0 = ninguno; 1 = poco; 2 = medio y 3 = abundante.

El comportamiento de la variable desarrollo de callo basal fue similar al de las etapas anteriores; ya que a pesar de que se eliminó de los brotes antes de ser recultivados o subcultivados, se volvió a formar. Otra vez puede notarse que la variedad Pinto Norteño fue la que presentó mayor porcentaje de enraizamiento (80%) y la línea LEF-1-RB, no alcanzó a formar raíces en éste tiempo; incluso, se perdió en un 95% por la oxidación de los tejidos. Aquí también se obtuvo un mayor alargamiento de los brotes que formaron raíces, alcanzando una longitud de 40-50 mm con hojas bien formadas, con raíces fuertes y vigorosas (figura 10).

4.1.4. Etapa IV: Aclimatación de Plántulas Regeneradas y su Transferencia al Suelo.

En las observaciones realizadas a las plántulas obtenidas en la Etapa I de los diferentes genotipos y que se transfirieron a suelo; se presentaron bajos índices de sobrevivencia; por lo tanto, cabe mencionar que sólo se observaron las primeras etapas de crecimiento; donde las plántulas regeneradas alcanzaron una longitud de 10-12 cm, después de un mes de su transferencia.

4.2. Discusión.

Durante el transcurso de todo el experimento se presentó la oxidación de los tejidos en las tres etapas *in vitro*, pero sólomente se utilizaron antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico) en los explantes establecidos en la Etapa I. Sin embargo; el empleo de estos para evitar la oxidación fue más que nada por razones de prevención, ya que en bioensayos realizados previamente con los mismos genotipos, se presentó obscurecimiento de los brotes debido; posiblemente, a diferentes factores que no se incluyeron en el análisis del experimento. Entre estos factores podemos citar 1) fallas técnicas en el cuarto de incubación, ya que en un principio



Figura 9. Enraizamiento de los brotes provenientes de la Etapa I. Variedad Pinto Norteño a los 30 días de cultivada en el medio MS + Cinetina + AIB. Mostrando la elongación del brote y el desarrollo de raíces.

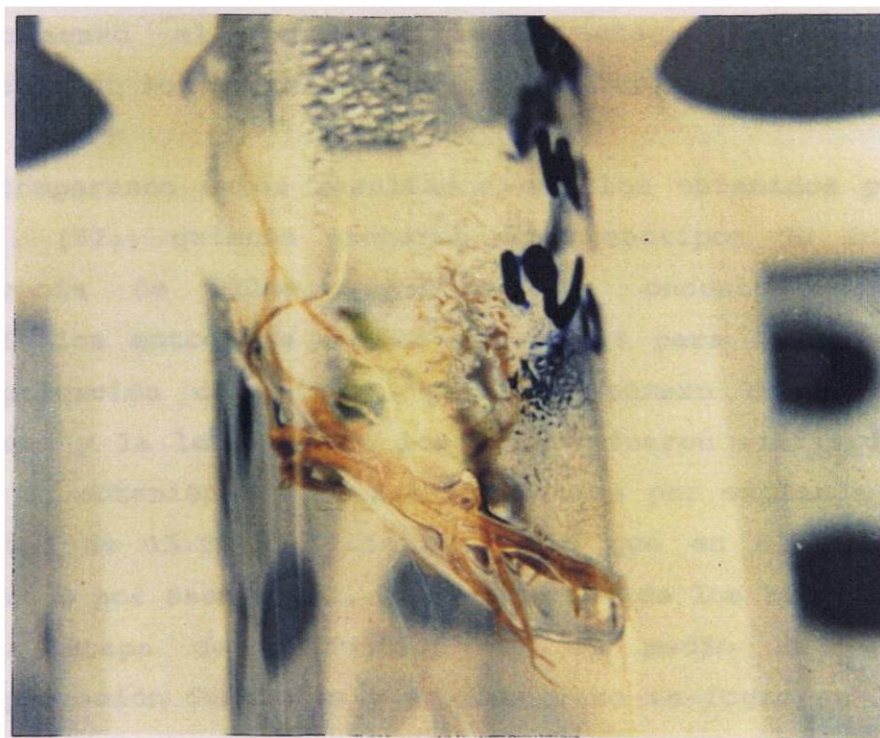


Figura 10. Aspecto general del enraizamiento de los brotes provenientes de la Etapa II. Variedad Pinto Norteño a los 21 días de cultivada en el medio MS + Cinetina + AIB.

no se tuvo un control eficiente y constante de la temperatura; 2) fallas en el método de desinfección; utilizándose posiblemente, una concentración alta (15% v/v) de la solución desinfectante la cual quemó al explante, predisponiéndolo a la oxidación y 3) características intrínsecas de los genotipos ensayados que pueden ser recalcitrantes para la propagación *in vitro*.

Por lo anterior; se trataron de corregir estos factores para controlar la oxidación: se mantuvo constante la temperatura, se disminuyó la concentración de la solución desinfectante (10% v/v) para que no afectara la viabilidad del explante pero que a su vez controlara eficientemente la contaminación y finalmente se utilizó la solución antioxidante. Sin embargo, en experimentos realizados posteriormente en éste mismo laboratorio, indican que no fue necesario incluir antioxidantes en la Etapa I, por lo que es lógico pensar que la oxidación fue ocasionada principalmente por la temperatura o por la desinfección. La oxidación que se presentó al final de cada etapa pudo superarse recultivando los brotes eliminándoles los tejidos muertos.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Saam et al. (42); quienes probaron dos genotipos de frijol, a diferencia de ellos, aquí no se encontró diferencia estadística entre los medios BI2 y BN3 para la inducción y multiplicación de brotes, pero el número de brotes por explante y la longitud de los mismos fueron similares en la Etapa I, obteniéndose de 2.0-2.5 brotes por explante con una longitud de 15.37 a 17.14 mm; sólo que en el experimento realizado por Saam et al, la elongación de los brotes ocurrió en la etapa de subcultivo en el medio BN3 para la multiplicación de brotes y en éste caso se logró en la etapa de enraizamiento, donde alcanzaron una longitud similar de 50 mm. Ellos obtuvieron de un 60-90% de enraizamiento en los genotipos cultivados en medio MS comparado con el 40-80% en

los genotipos aquí ensayados y cultivados en el medio donde se incluyó el AIB (medio D).

La obtención de 2.0-2.5 brotes por explante, puede explicarse con base en la morfología del brote apical. Observando exclusivamente el punto de crecimiento de los explantes aislados en el estadio de desarrollo antes mencionado, se pudo notar que la mayoría presentaba una yema apical y dos axilares; que sin lugar a dudas, fueron el origen de los brotes producidos. De ésta manera, se considera que el efecto producido en el número de brotes por explante se debió; principalmente, al estadio ontogénico de los brotes, -que fue casi similar para los diferentes genotipos-, y no por el efecto directo de los medios de cultivo de la Etapa I.

De igual manera se puede pensar que no existió un incremento significativo en la longitud de los brotes producidos; por el hecho de haber utilizado explantes de 10 mm, obteniéndose brotes de 15.37-17.14 mm en promedio. Sin embargo; volviendo a la morfología del brote apical, la formación de callo ocurrió sólo en el hipocotilo que acompañaba al punto de crecimiento, por lo que la longitud real fue tomada del desarrollo de las yemas apicales y axilares, por lo que se considera que aquí si existió efecto directo de los medios de cultivo ensayados sobre la longitud de los brotes y la formación de callo. Posiblemente se logre disminuir el desarrollo de callo eliminando el hipocotilo; dejando sólo el punto de crecimiento o ápice, origen de los brotes adventicios.

Analizando las respuestas organogénicas con las obtenidas por Zieg (59), Martins y Sondahl (34), Rubluo y Kartha (41) y Saam et al. (42); el patrón de respuestas fue similar, obteniéndose la formación de callo con la inclusión de auxinas al medio de cultivo y la inducción de brotación

adventicia por el efecto de las citocininas, especialmente cuando es utilizada la BA.

El objetivo en éste trabajo al utilizar el modelo de regeneración propuesto por Tisserat (50) y Hussey (27); era obtener organogénesis directamente del explante cultivado, evitando pasar por la etapa de callo. Sin embargo; en las tres etapas se obtuvo desarrollo del mismo; que incluso, en la etapa de multiplicación, se rediferenciaron brotes a partir de él después de los 15 días de recultivados los brotes regenerados. La explicación de esto; según Hu y Wang (23) y Hussey (27), es que el suministro de auxinas al medio de cultivo no es necesaria en la Etapa I o inducción de brotación, especialmente cuando se utilizan brotes apicales relativamente grandes (1.0 cm en éste caso) ya que el explante mismo contiene niveles de auxina (AIA) que son suficientes para promover el crecimiento; es por esto que una aplicación adicional al medio de cultivo tiende a producir callo en la base. Esta formación de callo pudo interferir en las respuestas de las variables longitud de brotes y número de brotes por explante ya que al estar en contacto con el medio de cultivo, la mayoría de los nutrientes y reguladores de crecimiento son utilizados para la inducción y proliferación de callo, de ésta manera los nutrientes no son translocados eficientemente para nutrir a los brotes.

En experimentos realizados posteriormente en éste laboratorio; utilizándose brotes apicales de 1.5-2.0 cm de longitud de las variedades Agrarista y Sabinito, indican que la elongación de los brotes (arriba de 40 mm) obtenidos en la Etapa I, fue mejor en el medio MS básico y uno de PDA (papa-dextrosa-agar) en comparación con los ensayados en éste experimento. El medio PDA fue utilizado en bioensayos para observar el porcentaje de contaminación sistémica en los explantes; pero al igual que en el medio MS, los brotes se desarrollaron con una marcada dominancia apical sin el total

desarrollo y despliegue de las hojas. Sin embargo; en la etapa de subcultivo para la mutiplicación en medio BN3, los brotes provenientes del medio MS mostraron una baja producción de brotes adventicios; e incluso, la muerte de ellos por oxidación. Los brotes que sobrevivieron, enraizaron satisfactoriamente en los medios aquí ensayados. Esto hace suponer; de acuerdo con Hussey (27); Brown y Thorpe (5), que es necesario un suministro inicial de reguladores de crecimiento, principalmente citocininas, esto cuando se utilizan meristemos y brotes apicales, donde es necesario romper la dominancia apical y promover la brotación axilar.

En lo que se refiere al enraizamiento de los brotes provenientes de la Etapa I; en todas las observaciones donde se formaron raíces ocurrió también el desarrollo de callo basal (excepto en el medio MS básico) lo que hace suponer que el callo se rediferenció para originar éstas. El problema estriba en afirmar si las raíces están conectadas (morfológicamente hablando) con los brotes adventicios, ya que sólo se observó que unas cuantas raíces se formaron del cuello del tallo. La elongación de los brotes después de 21 días de establecidos en los medios para enraizamiento, y después de que se formaron las raíces puede explicar esto; puesto que la elongación ocurrió tanto en los brotes de la variedad Pinto Norteño cultivados en el medio MS, así como ésta y los otros genotipos que se cultivaron en los medios donde se desarrolló callo.

Por otra parte; la reducción de un 100% a un 25-75% en la formación de callo basal, utilizándose BA y Cinetina, respectivamente, hace pensar que al emplear ésta última, puede reducirse o eliminar el desarrollo de callo en la etapa de inducción de brotación y multiplicación; sin embargo, hay que considerar las combinaciones que se hicieron con las concentraciones de AIA, ANA y AIB, ya que fueron relativamente más altas que las empleadas anteriormente, por

lo que se esperaba un mayor desarrollo de callo; pero no fue así, suponiéndose que existió un antagonismo entre las hormonas citocinina-auxina, ya que tampoco se promovió la brotación axilar en ésta etapa de enraizamiento.

En las observaciones realizadas en las plantas transplantadas a suelo; sólo se puede decir que falta investigar todavía más al respecto; sin embargo, se tienen antecedentes de experimentos realizados en éste laboratorio relacionados con la aclimatación de plantas microinjertadas de cítricos, donde se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia satisfactorio siguiendo el mismo procedimiento aquí empleado, sólo que el riego se realizaba con medio MS 50% líquido durante toda la fase de aclimatación de los cítricos. También en posteriores estudios con frijol de las variedades Agrarista y sabinito, a partir de su transferencia al suelo, el tiempo de aclimatación duró dos meses. Después de 15 días de transferidas las plántulas, cada 7 días se les hacía un orificio a las bolsas hasta el final, cuando se eliminaban por completo y listas para desarrollarse normalmente en el invernadero o en condiciones de campo.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones.

Con la información obtenida del presente experimento se concluye que:

- 1). Los medios BI2 y BN3 resultaron ser eficientes para inducir brotación y multiplicación de brotes, pero no existió diferencia estadística significativa entre ellos, observándose ligeras diferencias en las variables desarrollo de callo basal y número de brotes por explante en la Etapa II.
- 2). El medio de cultivo empleado para enraizamiento donde se obtuvieron los mejores resultados fue el constituido por MS básico + Cinetina 0.5 mg/L + AIB 3.0 mg/L.
- 3). En forma general, la variedad Pinto Norteño fue la que más sobresalió en todo el desarrollo *in vitro*, seguida por la Ciateño, Selección 4 y por último la línea LEF-1-RB; quién fue perdiendo viabilidad con los recultivos sucesivos, por lo que se considera que tiene otros requerimientos nutricionales.
- 4). Los resultados obtenidos con respecto al número de brotes por explante, longitud y enraizamiento de los mismos fueron satisfactorios. Eliminando los problemas inherentes al cultivo de tejidos vegetales y los contratiempos que se presentaron; se puede afirmar que la metodología desarrollada es eficiente aproximadamente en un 70%, pero puede superarse controlando mejor los factores que influyan en ella.

5.2. Recomendaciones.

Basándonos en todo lo anterior se recomienda:

- 1). Realizar pruebas de desinfestación de explantes utilizando otros métodos o en su defecto, combinar concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de remojo para disminuir aún más la contaminación.
- 2). En el caso de utilizar éste mismo modelo de regeneración en ésta especie, es conveniente que se busquen y ensayen otras combinaciones hormonales para evitar el desarrollo de callo basal en los explantes y si se emplean brotes de 0.5 cm de largo o más, se recomienda eliminar las auxinas para el establecimiento de los explantes en la Etapa I.
- 3). Ensayar otras concentraciones de AIB del medio D, que fue donde se observaron las mejores respuestas y así encontrar la mejor para el óptimo enraizamiento de los brotes
- 4). Contar y asegurar el funcionamiento de todo el equipo utilizado para proporcionar las condiciones de incubación óptimas, indispensables para el desarrollo de los cultivos *in vitro*.
- 5). Profundizar más en el estudio de la Etapa IV o aclimatación y establecimiento en el suelo para evaluar el comportamiento de las plántulas obtenidas *in vitro* hasta su madurez en condiciones de campo.

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. BEELEN, J. Introductory Course on *in vitro* Culture. Agricultural University. Wageningen, Netherlands.
2. BEVERSDOLF, W.D. and E.T. BINGHAM. 1977. Degrees of Differentiation Obtained in Tissue Cultures of *Glycine* species. *Crop Science* 17:307-311.
3. BINDING, H. and G. KRUMBIEGEL-SCHROEREN. 1984. Clonal Propagation: Shoot Cultures, pp 43-48. In: VASIL, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. I. Academic Press. New York.
4. BIONDI, S. and T.A. THORPE. 1981. Requirements for a Tissue Culture Facility, pp 1-20. In: THORPE, T.A. Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York.
5. BROWN, D.C.W. and T.A. THORPE. 1986. Plant Regeneration by Organogenesis, pp 49-65. In: VASIL, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. III. Academic Press. New York.
6. BURGESS, J. 1985. An Introduction to Plant Cell Development. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain.
7. CHALEFF, R.S. 1983. Isolation of Agronomically Useful Mutants from Plant Cell Cultures. *Science* 219:676-682.
8. CONGER, B.V. and G.B. COLLINS. 1982. A Discussion on Potential *in vitro* Applications for Agronomic Crops, pp 407-410. In: M.J.CONSTANTIN, R.R. HENKE, K.W. HUGHES, and B.V. CONGER. Proceeding Propagation

- of Higher Plants Through Tissue Culture: Emerging Technologies and Strategies. 12-15 October, 1980. University of Tennessee. Pergamon Press. New York.
9. CONSTANTIN, M.J. and T.A. CAMPBELL. 1982. Round-Table Reports on the Application of *in vitro* Technology to New Crops, pp 421-422. In: M.J. CONSTANTIN, R.R. HENKE, K.W. HUGHES, and B.V. CONGER. Proceeding Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture: Emerging Technologies and Strategies. 12-15 October, 1980. University of Tennessee. Pergamon Press. New York.
 10. DE MORALES FERNANDES, M.I.B. 1987. Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. *Pesq. Agrop. Bras.* 22:881-896.
 11. DIMOCK, A.W. Lectures. Cornell University. New York.
 12. DODDS, J.H. and L.W. ROBERTS. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain.
 13. DOUGALL, D.K. 1982. Media Factors Affecting Growth, pp 277-280. In: M.J. COSTANTIN, R.R. HENKE, K.W. HUGHES, and B.V. CONGER. Proceeding Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture: Emerging Technologies and Strategies. 12-15 October, 1980. University of Tennessee. Pergamon Press. New York.
 14. EVANS, D.A.; W.R. SHARP, and C.E. FLICK. 1981. Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis, pp 45-58. In: THORPE, T.A. Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York.

15. ---- ; ---- , and H.P. MEDINA-FILHO. 1984. Somaclonal and Gametoclinal Variation. Amer. J. Bot. 71:759-774.
16. GAMBORG, O.L. and J.P. SHYLUK. 1981. Nutrition, Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures, pp 20-44. In: THORPE, T.A. Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York.
17. ---- ; R.A. MILLER, and K. OJIMA. 1968. Nutrients Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
18. ---- ; T. MURASHIGE; T.A. THORPE, and I.K. VASIL. 1976. Plant Tissue Culture Media. In vitro 12:473-478.
19. GAUTHERET, R.J. 1955. The Nutrition of Plant Tissue Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 6:433-484.
20. HALPERIN, W. 1969. Morphogenesis in Cell Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 20:395-418.
21. HAMMATT, N.; T.K. GHOSE, and M.R. DAVEY. 1986. Regeneration in Legumes, pp 67-95. In: VASIL, I.K. cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.III. Academic Press. New York.
22. HORN, M.E. and C.C. DALTON. 1984. Photosynthetic Cell Cultures and Their Biotechnological Applications. Int. Asoc. Plant Tissue Culture Newsletter (43):2-7.
23. HU, C.Y. and P.J. WANG. 1983. Meristem, Shoot tip and Bud Cultures, pp 177-227. In: D.A. EVANS, W.R. SHARP, P.V. AMMIRATO, and Y. YAMADA. Handbook of Plant Cell

Cultures: Techniques of Propagation and Breeding.
Vol.I. Macmillan Publishing. New York.

24. HUANG, L.C. and T. MURASHIGE. 1976. Plant tissue Culture Media: Major Constituents, Their Preparation and Some Applications. T.C.A. Manual. University of California Riverside. California.
25. ---- ; R. VAN GUNDY, and T. MURASHIGE. Plant Tissue culture Fundamentals and Applications. Technical Bulletin. University of California Riverside. California.
26. HUGHES, K.W. 1982. *In vitro* Ecology: Exogenous Factors Affecting Growth and Morphogenesis in Plant cell Culture Systems, pp 281-288. In: M.J. CONSTANTIN, R.R. HENKE, K.W. HUGHES, and B.V. CONGER. Proceeding Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture: Emerging Technologies and Strategies. 12-15 October, 1980. University of Tennessee. Pergamon Press. New York.
27. HUSSEY, G. 1986. *In vitro* Propagation of Horticultural and Agricultural Crops, pp 111-138. In: S.H. MANTELL and H. SMITH. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain.
28. I.N.E.G.I. 1988. Abasto y Comercialización de Productos Básicos: Frijol. Aguascalientes, Ags. México.
29. KARTHA, K.K. 1984. Culture of Shoot Meristem: Pea, pp 106-107. In: VASIL, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.I. Academic Press. New York.

30. ---- ; K. PAHL; N.L. LEUNG, and L.A. MROGINSKI. 1982. Plant Regeneration from Meristems of Grain Legumes: Soybean, Cowpea, Peanut, Chickpea and Bean (Abstract). *Plant Growth Regulator Abs.* 8:202.
31. LAWRENCE, R.H. 1982. *In vitro* Plant Cloning Systems, pp 289-300. In: M.J. CONSTANTIN, R.R. HENKE, K.W. HUGHES, and B.V. CONGER. *Proceeding Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture: Emerging Technologies and Strategies.* 12-15 October, 1980. University of Tennessee. Pergamon Press. New York.
32. LEE B., A.M.E. 1986. Obtención de Plantas de Papa (*Solanum tuberosum* L.) Libres de Virus a partir de Clonaciones Meristemáticas *in vitro*. Tesis Licenciatura I.T.E.S.M. Monterrey, N.L. México.
33. LOPEZ PERALTA, M.C.G. 1976. Estudio Sobre el Desarrollo de Citocultivos de *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicon esculentum* en Medios Suplementados con Aguamiel y Agua de coco. Tesis Maestría C.P. Chapingo, México.
34. MARTINS, I.S. and M.R. SONDAHL. 1984. Multiple Shoot Formation from Shoot Apex Cultures of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.* 115:205-208.
35. MURASHIGE, T. Principles of Rapid Propagation. Institute of Agriculture Bulletin. University of Tennessee.
36. ---- . 1974. Plant Cell and Organ Culture Methods in Establishment of Pathogen-Free Stock. University of California Riverside Manual. California.
37. ---- . 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25:135-166.

38. ---- . 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture, pp 15-26. In: THORPE, T.A. Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. University of Calgary Press. Calgary, Canada.
39. ---- and F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
40. RANCH, J.P.; L. OGELSBY, and A.C. ZIELINSKI. 1986. Plant Regeneration from Tissue Cultures of Soybean by Somatic Embryogenesis, pp 97-110. In: VASIL, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.III. Academic Press. New York.
41. RUBLUO, A. and K.K. KARTHA. 1985. *In vitro* Culture of Shoot Apical Meristem of Various *Phaseolus* species and Cultivars. *J. Plant Physiol.* 119:425-433.
42. SAAM, M.M.; G.L. HOSFIELD, and J.W. SAUNDERS. 1987. *In vitro* Propagation of Dry Bean from Seedlings Shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sc.* 112:852-855.
43. SCHAEFFER, W.I. 1984. Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. *In vitro* 20:19-24.
44. SCOWCROFT, W.R. 1977. Somatic Cell Genetics and Plant Improvement. *Advances in Agronomy* 29:39-79.
45. SHABDE-MOSES, M. and T. MURASHIGE. Organ Culture. Technical Bulletin. University of California Riverside. California.
46. SKIRVIN, R.M. 1978. Natural and Induced Variation in Tissue Culture. *Euphytica* 27:241-266.

47. SKOOG, F. and C. TSUI. 1948. Chemical Control of Growth and Bud Formation in Tobacco Stem Segments and Callus Cultured *in vitro*. Amer. J. Bot. 35:782-787.
48. THORPE, T.A. and K.R. PATEL. 1984. Clonal Propagation: Adventitious Buds, pp 49-60. In: VASIL, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.I. Academic Press. New York.
49. TILTON, V.R. and S.H. RUSSELL. 1984. *In vitro* Culture of Immature Soybean Embryos. J. Plant Physiol. 115:191-200.
50. TISSERAT, B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration, pp 79-105. In: DIXON, R.A. Plant Cell a Practical Approach. I.R.L. Press. Washington.
51. TOMES, D.T. 1984. An Assessment of the Impact of Biotechnology on Plant Breeding. Inter. Asoc. Plant Tissue Culture Newsletter (42):2-9.
52. TONIN, G.S.; M.T.V. DE CARVALHO, W.R. SHARP, and O.J. CROCOMO. 1981. Aminoacids in the Callus Growth and Root Morphogenesis of Bean (*Phaseolus vulgaris*) Leaves Cultured *in vitro*. Turrialba 31:245-252.
53. TRAN THANH VAN, K.M. 1981. Control of Morphogenesis in *in vitro* Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 32:291-311.
54. VAN STADEN, J. and C. FORSYTH. 1985. Metabolism of Kinetin by Soybean Callus. Plant Growth Regulation 3:167-178.
55. VALENCIA M., L.A. 1987. Respuesta de Diferentes Niveles Hormonales para la Propagación de Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. Tesis Licenciatura

I.T.E.S.M. Monterrey, N.L. México.

56. VILLALOBOS A., V.M. 1979. Obtención de Plantas de Clavel (*Dianthus caryophyllus*) Libres de Virus por Cultivo *in vitro* de Meristemos y Apices Vegetativos. Tesis Maestría C.P. Chapingo, México.
57. WALKER, K.A.; P.C. YU, S.J. SATO, and E.G. JAWORSKI. 1978. The Hormonal Control of Organ Formation in Callus of *Medicago sativa* L. Cultured *in vitro*. Amer. J. Bot. 65:654-659.
58. WRIGHT, M.S.; M.G. CARNES, M.A. HINCHEE, G.C. DAVIS, S.M. KOEHLER, M.H. WILLIAMS, S.M. COLBURN, and P.E. PIERSON. 1986. Plant Regeneration from Tissue Cultures of Soybean by Organogenesis, pp 111-119 In: VASIL, I.K.. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.III. Academic Press. New York.
59. ZIEG, R.G. 1982. *Glycine max* (Soybean) and *Zea mays* (Corn) in Tissue Culture; Isolation, Growth, and Morphogenesis of Explants, Cells and Protoplasts (Abstract). Plant Breeding Abs. 52:577.

VII. APENDICE.

Cuadro 1A. Material y equipo más importante utilizado para la realización del experimento.

MATERIAL DE CRISTALERIA

Matraces Erlenmeyer de 1000, 500 y 100 ml
Vasos de precipitado de 1000, 500 y 100 ml
Probetas de 100, 25 y 10 ml
Pipetas de 10, 5, 1 y 0.5 ml
Tubos de ensaye 25 X 150 mm
Frascos Gerber^{MR}
Frascos ámbar de 100 ml

EQUIPO

Termómetro ambiental
Termoagitador
Potenciómetro
Balanza granataria
Balanza analítica
Cámara de flujo laminar
Timer
Olla de presión
mecheros
Tapaderas y tapones para cultivo de tejidos
Estantes con lámparas fluorescentes de luz blanca con intensidad de 3000 lux.

Cuadro 2A. Preparación de soluciones concentradas de sales de MS, vitaminas y reguladores de crecimiento empleadas en éste experimento.

<u>SALES MINERALES</u>	mg/100 ml
Solución No. 1 NITRATOS *	
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
Solución No. 2 SULFATOS	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3700.0
MnSO ₄ . H ₂ O	169.0
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	86.0
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.25
Solución No. 3 HALOGENOS	
CaCl ₂	3300.0
KI	8.3
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.25
Solución No. 4 PO ₄ , BO ₃ , MoO ₄	
KH ₂ PO ₄	1700.0
H ₃ BO ₃	62.0
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2.5
Solución No. 5 Na, Fe, EDTA	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	278.1
Na ₂ EDTA	373.1
<u>VITAMINAS</u>	
Tiamina	50.0
Acido nicotínico **	50.0
Piridoxina **	50.0

Cuadro 2A. Continuación....

<u>REGULADORES DE CRECIMIENTO</u>	mg/100 ml
AUXINAS	
Acido indolacético (AIA)	50.0
Acido naftalenacético (ANA)	50.0
Acido indolbutírico (AIB)	50.0
CITOCININAS	
Bencilaminopurina (BA)	50.0
Cinetina	10.0

* No se preparó solución de Nitratos, los reactivos se agregaron directamente al momento de preparar el medio.

** Se preparó una sólo solución mezclando las dos vitaminas.

Nota: Se deben predisolver los reguladores de crecimiento con 0.3 ml de NaOH o HCL 1.0 N por cada 10 mg de auxina o citocinina, respectivamente y subsecuentemente diluir en agua al volúmen establecido.

Cuadro 3A. Cantidades de los componentes para la preparación de los medios de cultivo ensayados en éste experimento (componente/L de medio).

COMPONENTE	MEDIOS DE CULTIVO					
	BI2	BN3	A	B	C	D
NH ₄ NO ₃ (mg)	1650	1650	1650	1650	1650	1650
KNO ₃ (mg)	1900	1900	1900	1900	1900	1900
Sol'n Nos. 2, 3, 4 y 5. (ml)	10	10	10	10	10	10
Mio-inositol (mg)	100	100	100	100	100	100
Sol'n Tiamina (ml)	2	2	2	2	2	2
Sol'n Piridoxina- ácido nicotínico (ml)	1	1	1	1	1	1
Sol'n BA (ml)	2	6	--	--	--	--
Sol'n Cinetina (ml)	--	--	--	5	5	5
Sol'n AIA (ml)	0.1	--	--	0.6	--	--
Sol'n ANA (ml)	--	0.2	--	--	1.2	--
Sol'n AIB (ml)	--	--	--	--	--	6
Sacarosa (mg)	3000	3000	3000	3000	3000	3000
pH	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9
Gelrite ^{MR} (mg)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

Nota: Los componentes se van agragando en el orden en que se enlistan.

