



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regeneración de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)
variedades Americano, Flor de Mayo,
Flor de Junio y Peruano.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A:
AIDA ODETTE AVENDAÑO VAZQUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MIGUEL LARA FLORES

2002



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Regeneración de Frijol (Phaseolus vulgaris L) variedades Americano, Flor de Junio Flor de Mayo y Peruano".
realizado por Aida Odette Avendaño Vázquez.

con número de cuenta 9419912-9 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Miguel Lara Flores

Propietario

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Propietario

M. en C. Aurora Zlotnik Espinoza

Suplente

M. en C. Rosenda Margarita Ponce Salazar

Suplente

Biol. Florencia Tiberia Aucán García Campusano

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

p.a.

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de Dr. Miguel Lara Flores, en el Programa de Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el apoyo económico de la Fundación TELMEX, la Fundación "Lorena Alejandra Gallardo" I de A. P. y el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura PROBETEL-UNAM.

El trabajo fue parcialmente financiado por CONACYT, proyecto No. G31751-B.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Lara, a la M. en C. Elia Diego y a la Dr. Judith Márquez por su asesoría en la realización de éste proyecto.

Al laboratorio de Desarrollo en Plantas y al laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM por permitirme el uso de sus instalaciones.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena y al Biól. Alfredo Gamboa por su ayuda en la toma de la micrografía.

Al Dr. Ramón Suárez, a Siriobska Baca Ruíz, a la Biól. Florencia Aucán, a la Dra, Gabriela Rosas y al Dr. Jesús Muñoz por su ayuda, comentarios y valiosas aportaciones.

A Fundación TELMEX, a la Fundación "Lorena Alejandra Gallardo" I. de A. P. (FLAG) y a PROBETEL-UNAM, por el apoyo económico.

DEDICATORIAS

A Alberto, Etelvina, Amaranta y Eréndira, por ser amor y apoyo.

A Maru por toda una historia juntas.

A Luz, Gabriel y Neftali, por ser parte importante de mi.

A Emilio, por la espera.

A Carla, Perla, Yuriditz y Aurora, por todo lo que he vivido, aprendido y compartido.

A Gerardo, Manuel, Mónica y Rogelio, por ser mundos tan distintos.

A Lev, Natalia, Niza, Enrique, Erika, Gabriela, Alejandra, Vanessa, Rubén e Iván, por estar ahí.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias y a mis compañeros de Taller.

A Miguel Lara, a Gabriela Rosas, a Miguel A. Villalobos y a Araceli Sánchez, por enseñarme sobre ciencia, pero sobre todo por enseñarme sobre vida.

A mis compañeros del Programa de Biología Molecular de Plantas del CIFN-UNAM, en especial a Elia, Elizabeth, Ramón, Sara, Sonia, Jesús y Maru.

A Judith Márquez por su asesoría y enseñanzas; a Ricardo y Ulises, por lo que me enseñaron; a todos ellos, junto con Edith, Flor, Karina, Lluvia y Mage, por su ayuda en los momentos de desesperación y por hacer de mi estancia en su laboratorio una de las mejores experiencias.

A Marina y Sonia, por ser cariño, entendimiento y experiencia; a Juan (balazochato), Katerina y Carlitos, por ser apoyo en la histeria; a Jacobo, Aide y Erwin. A todos por los buenos momentos, por haber compartido conmigo lo bueno, lo malo y lo inimaginable de mi estancia en Cuernavaca.

A los que compartimos " El Refugio científico", en especial a Carla.

A la FLAG con mucho cariño, agradeciéndoles su ayuda, pero sobre todo el que me hallan aceptado y hecho parte de una gran familia. A Julian Gallardo por todo su cariño, comprensión y dedicación, por creer en mi; a Mónica Borques por ser fuerza, apoyo, amor y entendimiento. A toda mi FLAGmilia, por ser distintos, por un tiempo y un espacio, por el queso y las galletas.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	1
JUSTIFICACIÓN	2
I INTRODUCCIÓN	3
1.1 Las leguminosas	3
1.2 El frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	4
1.2.1 Importancia alimenticia del frijol	4
1.2.2 Importancia económica y agrícola del frijol	5
1.2.3 Mejoramiento de frijol	6
1.3 Las variedades de Frijol (<i>P. vulgaris</i> L.) Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano	8
1.4 Cultivo de tejidos vegetales	10
1.4.1 Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales	11
1.5 Regeneración	12
1.6 Regeneración del frijol <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	15
1.7 Regeneración de variedades mexicanas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	17
II OBJETIVOS	18
III METODOLOGÍA	19
3.1 Procedencia de la semilla	19
3.2 Esterilización y selección de la semilla	19
3.3 Condiciones de germinación in vitro	19
3.4 Cultivo de explantes in vitro	19
3.5 Obtención y desarrollo de los brotes	22
3.6 Enraizamiento de los brotes	23
3.7 Aclimatación de los brotes enraizados	24
3.8 Condiciones de invernadero	24
3.9 Análisis estadístico	25
3.10 Análisis de la progenie	25
3.11 Análisis histológico	25
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Germinación in vitro	28
4.2 Cultivo de explantes y de brotes	28
4.3 Enraizamiento de brotes y aclimatación de brotes enraizados	32
4.4 Análisis de la progenie	36
4.5 Análisis histológico	36
V CONCLUSIONES	44
VI PERSPECTIVAS	45
VII REFERENCIAS	46
VIII ANEXOS	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regeneración de <i>P. vulgaris</i> L., diferentes trabajos de 1976 al 2000.	Pág. 17
Tabla 2. Medios analizados en la germinación (MG).	Pág. 20
Tabla 3. Medios utilizados para el cultivo de explantes (MIB).	Pág. 21
Tabla 4. Medio utilizado para el desarrollo de Brotes (MDB).	Pág. 22
Tabla 5. Medios utilizados para el enraizamiento (MR).	Pág. 24
Tabla 7. Efecto de la concentración de BAP en la respuesta morfológica de los explantes y UB cultivados en medio MIB y medio MDB.	Pág. 30
Tabla 8. Resultados finales del proceso de regeneración en <i>P. vulgaris</i> L. variedades Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano. Datos obtenidos de cuatro repeticiones para la variedad Peruano y tres repeticiones para las demás variedades.	Pág. 34

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *P. vulgaris* L. variedades Americano (A), Flor de Junio (B), Peruano (C) y Flor de Mayo (D). **Pág. 8**
- Figura 2.** Principales estados en los que se siembran las variedades Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano de frijol *P. vulgaris* L. **Pág. 9**
- Figura3.** Vías de regeneración por CTV. **Pág. 14**
- Figura 4.** Etapas del proceso de regeneración. A: germinación de semillas estériles cv. Flor de Junio, B: nodo cotiledonario como explante var. Americano, C: explantes en frasco y en caja Petri y D: medio MIB cv. Peruano. **Pág. 22**
- Figura 5.** Contenedores usados con medio MDB. A: frasco de vidrio, B: caja Petri, C: caja Magenta con flotador y tapa para intercambio gaseoso y D: membrana de polipropileno usada como soporte en las cajas Magenta. **Pág. 23**
- Figura 6.** Diagrama metodológico del proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. var. Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano. **Pág. 27**
- Figura 7.** Germinación y cultivo de explantes en *P vulgaris* L. A- Plántulas a los 10 días de germinación: 1) sin BAP, 2) BAP a 5 mg/1 , 3) BAP a 8 mg/1 variedad Peruano. B- Explantes cultivados sin BAP durante 1 semana y C- Explante cultivados en BAP (8 mg/1) por 1 semana, variedad Flor de Mayo. **Pág. 29**
- Figura 8.** Sobrevivencia de brotes enraizados de *P. vulgaris* L. al paso de condiciones *in vitro* a substrato en maceta. Comparación entre el uso de conos (barras negras) y el uso de cajas Magenta (barras blancas) en la aclimatación de brotes enraizados de las variedades Americano (Ame), Flor de Junio (FJ), Flor de Mayo (FM) y Peruano (Per) . Datos obtenidos de tres repeticiones para cada variedad. **Pág. 33**
- Figura 9.** A, plántula en cono; B, planta en caja Magenta; C, plantas en maceta dentro de la cámara de crecimiento; D y E, planta regenerada que muestra una floración precoz y asincrónica; F, plantas en condiciones de invernadero. **Pág.33**
- Figura 10.** Estrategia de regeneración para las variedades Americano (A), Flor de Junio (FJ), Flor de Mayo (FM) y Peruano (P) de *P. vulgaris* L. **Pág. 36**
- Figura 11.** Análisis de la progenie. A, variedad Flor de Mayo; B, 1) plantas provenientes del lote parental 2) F1, variedad Peruano. **Pág. 36**
- Figura 12.** Análisis histológico de la regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Flor de Mayo **Pág. 38**

Figura 13. Análisis histológico de la regeneración de *P. vulgaris* L variedad Peruano. **Pág. 39**

Figura 14. Análisis histológico de yemas y meristemos durante el proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Flor de Mayo. **Pág. 41**

Figura 15. Análisis histológico de yemas y meristemos durante el proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Peruano. **Pág. 41**

Figura 16. Compuestos ejemplos de los diferentes grupos de fitorreguladores **Pág. 57**

ABREVIATURAS

AgNO ₃	Nitrato de plata.
BA	N ⁶ -benzilamina
BAP	N ⁶ -benzilaminopurina
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CPPU N	Forclorofeuron
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
FAA	Formol, Ácido acético, Alcohol etílico
IAA	ácido 3-indolacético
IBA	ácido 3-indobutírico
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
GA ₃	ácido giberélico
Kin	medio de desarrollo de brotes
MDB	medio de germinación
MG	medio de inducción de brotes
MIB	medio de enraizamiento
MR	medio basal de Murashige y Skhoog con vitaminas de Gamborg,
MS/B5	SIGMA; St. Luis,MO ácido α -nafatlénico
NAA	Programa Cooperativo Regional de Investigación en Frijol para
PROFRIJOL	Centroamérica, México y el Caribe.
RAM	Meristemo apical de la raíz (siglas en inglés)
RCV	Regulador de crecimiento vegetal
SAM	Meristemo apical del brote (siglas en inglés)
tTCLs	Capas celulares de tejidos (siglas en inglés)
TDZ	N-fenil-N ¹ -(1,2,3 tiazol-yl) urea (tidiazuron)
UB	Unidad de brote
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue el establecimiento de un protocolo de regeneración para las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano.

Partiendo de plantas con diez días de edad, germinadas, bajo condiciones controladas, en medio de Murashige y Skoog (MS) sólido suplementado con vitaminas de Gamborg (B5) y N⁶-benzilaminopurina (BAP), se aislaron nodos cotiledonarios, que fueron cultivados, de dos a cuatro semanas, dependiendo de la variedad, en las mismas condiciones antes mencionadas. Los brotes que se produjeron se separaron y cultivaron en medio MS/B5 líquido, en ausencia del regulador de crecimiento vegetal; los subcultivos se realizaron cada 3 semanas. Los brotes obtenidos, que presentaron una raíz principal mayor a 3 cm, fueron cambiados a sustrato, basado en una mezcla agrolita-vermiculita 1:1 contenido en cajas Magenta. Una vez que las plantas obtenidas presentaron una altura mayor a los 10 cm, fueron cambiadas a macetas y sometidas a un periodo de aclimatación de 15 días antes de llevarlas a condiciones de invernadero.

Los resultados indican que para la inducción de brotación múltiple la concentración óptima de BAP fue de 2.5 mg/l para la variedad Flor de Junio, 5 mg/l para las variedades Flor de Mayo y Peruano, y de 8 mg/l para la variedad Americano. El uso de medios líquidos fue un punto clave para el desarrollo de brotes y su posterior enraizamiento. La utilización de cajas Magenta con membrana, que permiten el intercambio gaseoso, fue determinante para el paso exitoso de condiciones *in vitro* a condiciones de invernadero.

El estudio histológico demuestra la existencia de una brotación múltiple, habiendo brotes que se desarrollan de meristemas preexistentes (brotes axilares) y de meristemas formados de novo (brotes adventicios) vía organogénesis directa. Durante el análisis se observó la presencia de una estructura de organización celular semejante a un embrión en etapa globular, que puede tomarse como indicio de una embriogénesis somática directa.

JUSTIFICACIÓN

En México, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento básico y predominante, de una gran importancia cultural y económica, que ha alimentado al pueblo mexicano desde la época precolombina. En este país el frijol se cultiva de muchas maneras y para diferentes usos, por lo cual muestra una distribución geográfica muy amplia.

Dada su importancia, los estudios sobre frijol han aumentado en las últimas décadas, siendo su mejoramiento un tema de gran interés. La investigación sobre esta especie se ha dirigido hacia la búsqueda y el desarrollo de variedades de frijol resistentes a patógenos, tolerantes a sequía y a baja fertilidad del suelo, entre otros atributos, con el principal propósito de incrementar su productividad y rendimiento. Con este objetivo se han utilizado diferentes tecnologías, desde las tradicionales hasta las derivadas de la biotecnología. Sin embargo, hasta el momento la transferencia de genes mediante ingeniería genética no se ha logrado, debido a que el frijol ha mostrado ser una especie recalcitrante para la regeneración por cultivo de tejidos vegetales, lo que se considera un requisito básico para lograr la transformación genética y para que ésta pueda volverse un método rutinario de mejoramiento de frijol.

Cabe mencionar que el establecimiento de un proceso eficiente de regeneración en *Phaseolus vulgaris* L. además ayudaría a la realización de estudios sobre su metabolismo, genoma e interacción con otros organismos, así como de procesos básicos de fisiología y desarrollo de esta especie.

Por tal motivo el presente trabajo, al plantear un protocolo de regeneración para algunas de las variedades más importantes de *Phaseolus vulgaris* L. en México, contribuye de manera significativa al conocimiento del frijol.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Las leguminosas

Las leguminosas (familia *Leguminosae*) constituyen uno de los taxones más extensos dentro de las angiospermas (junto con las compuestas, gramíneas y orquídeas) siendo uno de los mejor conocidos y de distribución cosmopolita; este grupo comprende plantas anuales y perennes, de crecimiento herbáceo, arbustivo y arbóreo, y con mecanismos de reproducción tanto de autopolinización como de polinización cruzada o autoincompatibles (Mroginski y Kartha, 1985).

Como características distintivas de las leguminosas se pueden mencionar:

- su fruto, comúnmente denominado vaina, que se deriva de un solo carpelo
- la toxicidad de sus semillas (en su mayoría), ya que presentan proteínas y péptidos capaces de inhibir enzimas digestivas (Engleman, 1979; Nagl, *et al.*, 1997)
- su capacidad para asociarse simbióticamente con bacterias del género *Rhizobium*, lo que les permite adquirir nitrógeno, derivado de la actividad de la enzima nitrogenasa presente en las bacterias.

Económicamente, las leguminosas son apreciadas por su valor como alimento para el humano, como forraje, y como materia prima para la industria (Mroginski y Kartha, 1985); éste taxón excede, tanto en número como en densidad, a cualquier otro de plantas cultivadas así como en importancia de uso, sólo los cereales las superan en consumo (Christou, 1997). Como una muestra de la importancia de las leguminosas para el hombre, está el hecho de que la mayoría de las civilizaciones han basado gran parte de su alimentación en ellas.

Cabe mencionar que las semillas de leguminosas en general, tienen un alto contenido nutricional de carbohidratos, proteínas (por arriba de los cereales) y grasas (como la soya y el cacahuate); son ricas en tiamina y niacina, y son bajos en riboflavina y muy bajos en vitamina A, C y B₁₂ (Allavena, 1984).

Debido a que proveen al humano con una cantidad significativa de su requerimiento protéico, en los países en desarrollo se ha hecho hincapié en incrementar su cultivo. En este contexto las técnicas tanto convencionales como biotecnológicas han jugado un papel importante para su mejoramiento; sin embargo, aún con los enormes recursos económicos destinados al mejoramiento de plantas cultivadas mediante los nuevos procesos biotecnológicos, sólo a la soya y al cacahuate se le ha dado mayor atención que a las demás leguminosas, lo que se debe principalmente a que la mayoría han mostrado ser recalcitrantes para la regeneración *in vitro*, lo es un prerrequisito para la transferencia específica de genes y la ingeniería genética práctica, destinadas al mejoramiento de plantas (Christou, 1997).

1.2 El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El género *Phaseolus* pertenece a la familia *Leguminosae*, a la subfamilia *Papilinoideae*, a la tribu *Phaseoleae* y a la subtribu *Phaseolinae* (Heywood, 1993). El número exacto de especies que comprende este género es desconocido; sin embargo, se ha propuesto que contiene alrededor de 150. En México existen alrededor de 50 especies, entre las que se encuentran *Phaseolus vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. lunatus* L. y *P. acutifolius* A. Gray, todas ellas especies domesticadas que han alimentado a los pueblos de América (junto con el maíz) desde la época precolombina y que actualmente se cultivan de manera intensiva (Hernández y Ramos-Alfaro, 1979; Nagl, et al., 1997).

La especie *Phaseolus vulgaris* L. es la mejor conocida y la de mayor distribución dentro del género *Phaseolus*; además se considera la especie más importante en la alimentación del pueblo mexicano, seguida de *P. coccineus* (frijol ayocote) (Hernández y Ramos-Alfaro, 1979).

Phaseolus vulgaris L. es una especie polimórfica. Es una planta herbácea, anual, que muestra una gran variación en hábitos de crecimiento, existiendo desde los tipos trepadores (de hasta 3 m de altura) hasta arbustos "enanos" (no más altos de 60 cm). Presenta una gran variación en el color de las flores (blancas, amarillas, rosas y violetas) y en el tamaño, forma y color tanto de vainas (de amarillo a verde) como de semillas. Todas las formas poseen una raíz principal bien desarrollada, con raíces laterales, que en su mayoría se encuentran en la zona superior de la rizósfera. Los tallos pueden ser delgados, retorcidos, angulosos y nervados. Las hojas son alternas, trifoliadas y a menudo pilosas. Su germinación es epigea. Las plantas de frijol alcanzan su madurez entre los 60 y los 150 días de siembra y su floración se da entre los 40 y 70 días. Es una especie de autopolinización (Engleman, 1979). Para su crecimiento se requiere de temperaturas entre los 10°C y los 30°C, una humedad relativa óptima de 50% y suelos con un pH de 6.0 a 6.8. Crece como monocultivo, cultivo de asociación y de rotación (INIFAP, 2001).

El frijol es atacado por un gran número de plagas y enfermedades, entre las que se encuentran la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), el moho (*Uromyces phaseoli*), *Pseudomonas* (*Pseudomonas phaseoli*), nemátodos (*Meloidogyne* spp.) y el virus del mosaico del frijol (SAGARPA, 2001).

1.2.1 Importancia alimenticia del Frijol

Para los pueblos precolombinos el frijol junto con el maíz representaban el suplemento proteico más importante en su dieta, debido a que no contaban con ganado y tenían pocas especies animales bajo domesticación (como el guajolote), pero si poseían una agricultura bien desarrollada (Hernández, et al., 1979). Actualmente el frijol constituye el componente principal en la dieta diaria para más de 700 millones de personas en el

mundo, en especial para aquéllas de bajos recursos en los países en desarrollo de América y África. Se considera una excelente alternativa como fuente de proteínas en varios países desde India, cuya población presenta un muy bajo consumo de proteína animal, hasta Estados Unidos, en el que la población de régimen vegetariano ha aumentado en las últimas décadas (Kaplan, 1999; CIAT, 2001).

El frijol está considerado, después de la soya, como la segunda leguminosa más importante en América (Nagl, *et al.*, 1997) en dónde, aún con la presencia de ganado y otras fuentes de proteínas, la dieta de una gran parte de su población sigue basándose en la relación frijol y maíz, la cual por otro lado presenta como característica principal la complementarización en cuanto a contenido de aminoácidos, entre la zeína (la principal proteína del maíz) y las globulinas a y b del frijol; el maíz es deficiente en lisina y triptofano, mientras que el frijol (de diferentes variedades y especies) tiene una cantidad abundante de ambos (Kaplan, 1965).

El frijol en general, es rico en proteínas (casi dobla el contenido proteico de los cereales), aunque la cantidad de éstas parece depender de la variedad, la fecha de siembra y cosecha, y de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Allavena, 1984). El frijol también contiene algunas grasas, una gran cantidad de fibra, carbohidratos, vitaminas, hierro, fósforo, magnesio, manganeso y en menor grado, zinc, cobre y calcio. Por otro lado, el frijol también presenta sustancias tóxicas que son parcialmente inactivadas por el cocimiento (Engleman, 1979). De esta manera el frijol es considerado como el alimento "casi perfecto", cuya importancia nutricional aumenta en los sectores sociales de menores recursos.

1.2.2 Importancia económica y agrícola del frijol

Tradicionalmente el frijol es considerado como un cultivo de subsistencia y de consumo doméstico, principalmente en las zonas rurales, cuya comercialización ha aumentado en zonas urbanas a medida que éstas han ido creciendo y que se ha incrementado la migración hacia las grandes ciudades. Por otro lado, desde hace poco más de dos décadas, el frijol se ha integrado al mercado internacional, donde las variedades pinto y negro son las variedades más comercializadas. Por tal motivo es posible encontrar la producción de frijol a pequeña y gran escala; en México, alrededor del 67% de la producción de frijol está a cargo de pequeños productores (CIAT, 2001). Todo esto sitúa al frijol en un contexto socioeconómico bastante complejo, debido a que es un cultivo básico, tradicional y culturalmente aceptable, altamente rentable y con una demanda permanente, que sin embargo, disminuye en consumo a medida que el nivel económico de la población se eleva.

En América, el frijol es uno de los cultivos más antiguos, y está considerado dentro de los más diversos debido a:

- La variedad de métodos de cultivo: monocultivo, cultivo de asociación (siendo maíz-frijol el más común) y de rotación, en el que se requiere de un ciclo de vida corto que muy pocas especies presentan. Además, mientras que las variedades arbustivas ofrecen poca competencia al intercalarse con otras especies, por lo que se puede aplicar también en proyectos de reforestación o como cultivo secundario, y variedades trepadoras que se pueden tener como cosecha continua.
- Sus múltiples usos: como grano maduro, como semilla inmadura y como ejotes.
- Por el amplio rango de nichos a los cuales se ha adaptado: el frijol Peruano se produce en ambientes tropicales secos, mientras que el Flor de Mayo en climas templados (INIFAP, 2001). Además es un hecho que el frijol se da en ambientes donde el cultivo de otras especies fracasa.
- Por su variabilidad morfológica: diferentes hábitos de crecimiento, tamaño y color de la semilla, entre otras; tal variabilidad ha resultado principalmente del cultivo de mezclas de diferentes tipos de frijol por los agricultores a lo largo de miles de años, buscando combatir sequía, enfermedades y plagas, desarrollando así su fitomejoramiento (Kaplan, 1965; CIAT, 2001).

Cabe mencionar que la diversidad existente en todos los aspectos (especies cultivadas, formas de cultivo, formas de aprovechamiento y de transformación para el consumo) es muestra de una larga y estrecha relación hombre planta.

1.2.3 Mejoramiento de frijol

Por todo lo anterior, el interés en el estudio sobre frijol ha generado diversos programas de investigación relacionados a su producción, mejoramiento y utilización. En este contexto, en América Latina las universidades y el sector privado han jugado un papel importante, no así el sector público; mientras que en los países desarrollados como Estados Unidos se ha enfatizado en la producción y en Europa se ha centrado en el frijol como modelo en ciencia básica (CIAT, 2001; INIFAP, 2001; PROFRIJOL, 2001). En general, la mayoría de éstos programas abarcan el estudio de las enfermedades, plagas, estrés abiótico y la baja fertilidad de suelos (también al manejo y conservación de éstos), que representen algunos de los “riesgos” a los que los agricultores se enfrentan. Existen muy pocos programas que se refieran a la certificación de semilla, así como estudios que traten aspectos sobre la producción “tradicional” de frijol y de validación de tecnologías, en contraste uno de los problemas en el que se ha enfatizado es en el rendimiento.

Sin olvidar la trascendencia del mejoramiento en la producción y calidad de frijol que se basa en el conocimiento tradicional de su cultivo y en el uso de otros organismos, como por ejemplo la fertilización biológica basada en cepas de *Rhizobium*, se le ha dado gran importancia a la identificación de germoplasma con caracteres específicos, entre los que se encuentran la tolerancia a sequía y la resistencia a enfermedades, para crear un banco de germoplasma con el propósito de utilizarlo en el mejoramiento de frijol. Con este fin, se han utilizado varias disciplinas, tales como genética vegetal, fitopatología, genética

molecular y fisiología vegetal, entre otras, que si bien emplean herramientas diferentes, son mutuamente complementarias (CIAT, 2001; INIFAP, 2001; PROFRIJOL, 2001).

Hasta el momento, el mejoramiento de frijol se ha enfocado en incrementar el contenido protéico y la calidad de ciertas proteínas, como la faseolina. También en aumentar la cantidad de aminoácidos ricos en azufre, como la metionina y la cisteína, la de riboflavina, vitaminas A, C y B₁₂, así como en la reducción de factores tóxicos que inhiben la digestión como las fitohemaglutininas (PHA) e inhibidores de la alfa-amilasa. Por otro lado, también se ha trabajado en el incremento de la resistencia al estrés hídrico, a insectos, a varios tipos de patógenos y a herbicidas de amplio espectro (Nagl, *et al.*, 1997).

El fitomejoramiento ha hecho contribuciones importantes en diferentes aspectos relacionados con la agricultura, no sólo con respecto a la resistencia a estrés o a una mayor producción por parte de las especies vegetales, también en otros factores, ya que la resistencia a enfermedades y plagas puede evitar el uso de plaguicidas, disminuyendo el costo de producción, tanto económico como ambiental (toxicidad). La tolerancia a estrés abiótico, a la baja disponibilidad de fósforo y a baja fertilidad del suelo, disminuyendo la cantidad de insumos aplicados, lo que puede llegar a beneficiar a los productores (pequeños o grandes) permitiéndoles aumentar la productividad y lograr un mayor rendimiento. Además de estos beneficios, se agrega el evitar la expansión de área de cultivo a zonas ecológicamente frágiles, que implica un alto costo al ambiente (CIAT, 2001).

Aunado a esto y en igual importancia, se deben tomar en cuenta los problemas hasta ahora no resueltos que el mejoramiento genético no puede satisfacer, la escasez de tierra, agua y mano de obra; y a los cuestionamientos que puede conducir, especialmente si no existe una regulación bien establecida de uso y producción de transgénicos, si no se coordina con un manejo de recursos naturales (explotación y conservación) y si preexiste un mal empleo político y económico.

Tomando en cuenta lo anterior, la transformación genética de plantas se considera una herramienta poderosa y precisa que complementa los programas tradicionales utilizados para el mejoramiento de frijol. Sin embargo, la transformación de frijol no forma parte todavía de un plan rutinario de mejoramiento, debido principalmente a que no existe aún un sistema eficaz de transformación genética, donde la falta de un protocolo eficiente de regeneración ha sido el principal impedimento, ya que *P. vulgaris*, al igual que otras leguminosas, ha mostrado ser recalcitrante a la regeneración *in vitro*. (Nalg, *et al.*, 1997; CIAT, 2001).

Hasta el momento de los diferentes métodos utilizados para la transformación de frijol la transformación mediada por *Agrobacterium* (Kapila, *et al.*, 1997; Diego, 1998), la transformación directa de protoplastos (Leon, *et al.*, 1991) y el bombardeo (Kim y

Minamikawa, 1996) ha mostrado se los más prometedores. También cabe mencionar la electroporación (Saker y Kühne, 1997 y 1998) y la aceleración de partículas (Russell, *et al.*, 1993).

1.3 Las variedades de Frijol (*P. vulgaris* L.) Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano

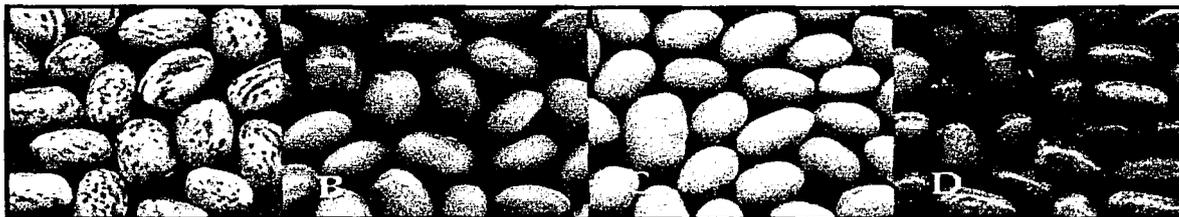


Figura 1. *Phaseolus vulgaris* L. variedades Americano (A), Flor de Junio (B), Peruano (C) y Flor de Mayo (D).

P. vulgaris L. variedad Americano

Las plantas pertenecientes a esta variedad llegan a tener alrededor de 49 cm de altura, con crecimiento indeterminado y de semiguía corta, que florecen a los 39 días después de la siembra, y alcanzan su madurez fisiológica a los 80 días; esta variedad se considera de ciclo precoz. Las flores que produce son blancas, las vainas alcanzan los 10 cm de largo y en su desarrollo van tomando una coloración rosa con manchas rojas. Esta variedad es susceptible a la antracnosis, a la roya o chahuixtle, al tizón común y al tizón de halo. Se siembra en terrenos de riego y temporal en los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas (SAGARPA, 2001) (Fig. 2A y Fig.3).

P. vulgaris L. variedad Flor de Junio

Flor de Junio ocupa el segundo lugar en cuanto a consumo e importancia económica; cabe mencionar que es una variedad no mejorada. Esta variedad produce plantas con hábito de crecimiento indeterminado, que llegan a alcanzar los 50 cm de altura, florecen a los 73 días después de la siembra y alcanzan su madurez fisiológica a los 126 días. Sus flores son blancas y las vainas son ligeramente curvadas, verdes, que en la madurez se tornan rojizas y finalmente amarillas, que llegan a medir hasta 11 cm de largo. Su semilla es de color rosado con una manchas alargadas color crema. Se siembra en terrenos de riego y temporal en todo el país, principalmente en Zacatecas y Guanajuato (SAGARPA, 2001) (Fig. 2B y Fig. 3).

P. vulgaris L. variedad Flor de Mayo

Esta variedad es la de mayor consumo e importancia económica, principalmente en la región centro del país. Produce plantas de alrededor de 50 cm de altura, con hábito de crecimiento determinado, que florecen a los 60 días de cultivo y alcanzan su madurez fisiológica a los 105 días. Las flores son blancas, sus vainas verdes no mayores de los 10 cm de largo, y la semilla es rosa con manchas color crema. Esta variedad es neutral en su respuesta a la duración del día. Flor de Mayo es resistente a la roya o chahuixtle, a la virosis y al moho blanco. Se siembra de riego y de temporal en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tlaxcala y Zacatecas (SAGARPA, 2001) (Fig. 2C y Fig. 3).

P. vulgaris L. variedad Peruano

La variedad de frijol Peruano también es llamada Frijol Azufrado, debido al color del grano, que es amarillo "azufrado". Produce plantas de alrededor de 43 cm de altura, cuyo hábito de crecimiento es determinado y semirrecto, sin guía. Las plantas alcanzan su madurez fisiológica a los 100 días de siembra, mientras que la floración se presenta a los 43 días. Las flores son blancas. Las vainas son ligeramente curvas, de color verde, que al acercarse a la madurez se tornan amarillas. Esta variedad es resistente a la roya o chahuixtle y por su hábito de crecimiento puede escapar del ataque del moho blanco. Se siembra principalmente en los estados de: Baja California Sur, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Tlaxcala. Se siembra de riego y temporal. Se encuentra dentro de las variedades de frijol recomendadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA (SAGARPA, 2001) (Fig. 2D y Fig. 3).

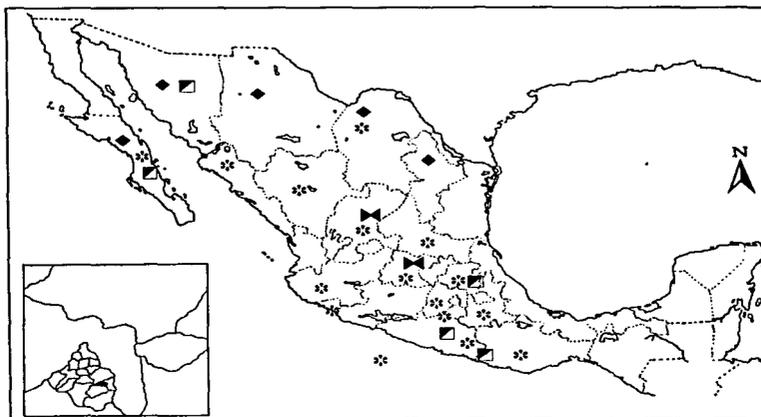


Figura 2. Principales estados en los que se siembran las variedades de frijol *P. vulgaris* L. Americano (◆), Flor de Junio (♣), Flor de Mayo (*) y Peruano (◻).

1.4 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) comprende, en un sentido amplio, el cultivo *in vitro* de partes aisladas de plantas denominados explantes o inóculos, en medios nutritivos y condiciones estériles (Mroginski y Kartha, 1985). Así el CTV abarca el cultivo de protoplastos, de células, de tejidos y de órganos.

El CTV tiene su origen a finales de los años 30's del siglo pasado, cuando se obtuvieron cultivos exitosos de zanahoria (*Daucus carota*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) y las técnicas se multiplicaron rápidamente durante la segunda mitad del siglo; éstas se desarrollaron tomando como base los métodos de cultivo de microbiología, suministrando *in vitro* equivalentes exógenos de nutrientes requeridos *in situ*, que se obtienen o derivan del metabolismo, en especial del de las raíces y de la fotosíntesis, que incluyen fuentes de carbono y nitrógeno, y sales inorgánicas, entre otros (Stepan-Sarkissian, 1990).

Las técnicas de cultivo de tejidos aprovechan el fenómeno de la totipotencialidad celular, el cual se refiere a la posibilidad que tiene toda célula nucleada de originar a un organismo con las mismas características del individuo del que proviene. En el cultivo de tejidos vegetales se manipulan diferentes factores (como luz, reguladores de crecimiento, micro y macro nutrientes, pH, entre otros) buscando inducir una reprogramación celular, que implica una adquisición de competencia (la cual involucra rediferenciación celular), una inducción (hacia una ruta de desarrollo) y una posterior rediferenciación celular, con el propósito de obtener la formación de estructuras vegetales, como embriones y/o brotes, de las cuales puedan obtenerse plantas completas. Cabe mencionar que la diferenciación es un proceso celular que implica por un lado el que una célula resulte distinta a su precursora y por otro, que esta célula cambie respecto a sus células vecinas; así, una vez que se da el progreso hacia una vía de desarrollo (que implica crecimiento y diferenciación), éste es ineludible, a no ser que se proporcione el estímulo apropiado; y si bien la desdiferenciación (fase de callo) es considerada como un requisito para que se de ese cambio, la rediferenciación se puede dar sin pasar por esta fase (Esau, 1977; Burgess, 1985; Bhojowani y Razda, 1989; Joy IV y Thorpe, 1999).

Durante el desarrollo (ontogenia) de una planta, el crecimiento y la diferenciación celular se coordinan dando lugar a la formación de tejidos y órganos, por lo que la planta adquiere una forma específica, fenómeno conocido como morfogénesis. Se ha propuesto que en la iniciación del cultivo, la inducción de la rediferenciación y la obtención de plantas completas dependen de que sea posible el manipular el proceso de determinación, la cual se refiere a una especialización en la función que tiene una célula. Sin embargo, hasta el momento, tanto el o los mecanismos como los factores críticos que afectan los diferentes estados de desarrollo en una estructura o planta completa están por establecerse. Es por ello que en la mayoría de los casos la iniciación y el progreso de un cultivo se llevan a cabo de manera empírica, por ensayo y error, es decir, variando

las condiciones del cultivo hasta que la respuesta deseada es obtenida (Yeoman, 1986; Bhojowani y Razda, 1989; Warren, 1991).

Se ha propuesto que el éxito del CTV depende de varios aspectos:

- El tipo de explante. Partes aisladas de plantas, a cualquier nivel de organización, como polen y microesporas, el óvulo, el cigoto, tejidos de ovario, de embriones cigóticos, de hojas, de semillas jóvenes, ápices de raíz y de tallo, partes de hojas, de flores, entre otros. Si bien, se acepta de manera general que cualquier explante puede entrar en una vía morfogénica deseada, se ha probado que esto no siempre sucede, lo que puede depender del genotipo y del estado fisiológico de la planta de la que se obtuvo. Es por ello que la elección del explante es un factor crítico, que generalmente determina el éxito de la mayoría de los experimentos de cultivo de tejidos (Lakshmanan y Taji, 2000).
- Reguladores de crecimiento vegetal (RCV) o fitohormonas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico (ABA), etileno y compuestos que actúan de manera similar a éstas como poliaminas, brassinoesteroides, jasmonatos y oligosacarinas. (Para más información ver el **Anexo 1**). Estos compuestos debido a su síntesis, degradación y/o concentración influyen sobre una o varias vías del desarrollo vegetal estimulando, inhibiendo o modificando de alguna forma los procesos de desarrollo y regeneración de una planta. La calidad de respuesta, el tipo y concentración de RCV exógeno dependen de su "buen" transporte, de su estabilidad química, de su localización y de los niveles endógenos de la planta. Se considera que la regeneración vegetal en CTV está determinada por el régimen impuesto de reguladores de crecimiento vegetal (Davies, 1990; Granell y Carbonell, 1995; Kende y Zeevaart, 1997; Creelman y Mullet, 1997 a y b).
- Composición de los medios: tipo y cantidad de las fuentes de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas y vitaminas. Cabe mencionar los azúcares tienen una función esencial en el metabolismo de las plantas; son importantes para el metabolismo intermediario y la respiración, en la biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos, y son compuestos involucrados en la señalización celular. Algunos azúcares, como glucosa, maltosa y trealosa, parecen estar involucradas en la división y diferenciación celular, además desde hace varios años se ha propuesto que la sacarosa puede llegar a actuar como un factor morfogénico importante. (Bhojowani y Razda, 1989; Smeekens, 2000).
- Factores físicos: tipo de medio (sólido o líquido); calidad, intensidad y tipo de luz (luz azul, luz roja, por ejemplo); el fotoperíodo, la temperatura, el pH, el ambiente gaseoso y presión osmótica (Yeoman, 1986; Demeester, *et al.*, 1995).

1.4.1 Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

El uso de las técnicas de cultivo de tejidos es muy amplio en:

- Propagación de plantas de interés comercial, desde especies comestibles, especies forestales importantes, hasta especies de ornato.

- Multiplicación de clones, de especies difíciles de regenerar por otras vías y de especies en vías de extinción.
- Propagación vegetativa de especies sexoestériles y con genotipos incompatibles.
- Generación de plantas libres de patógenos sistémicos (especialmente de virus).
- Preservación tanto del germoplasma inalterado como del genéticamente alterado, con el propósito de un intercambio internacional de material génico y del desarrollo de técnicas criogénicas para su preservación.
- Estudio de procesos fisiológicos y de desarrollo vegetal, al permitir investigar los factores que controlan la diferenciación citológica, histológica y organogénica.
- Obtención de metabolitos secundarios y evaluación de su actividad farmacológica (Yeoman, 1986; Evans, 1990; Hall, 1999).

Además de los usos antes mencionados, se ha buscado establecer técnicas especializadas de CTV para una aplicación práctica en el mejoramiento de distintas especies vegetales generalmente aquellas de importancia agrícola; como ejemplo tenemos el cultivo de anteras, para la producción de haploides; el cultivo de embriones, para superar la incompatibilidad postcigótica, y el cultivo de protoplastos para la hibridización somática por medio de la fusión de éstos (Mroginski y Kartha, 1985).

La vinculación entre técnicas de CTV y los métodos biotecnológicos, derivados de la genética, biología molecular y de técnicas de DNA recombinante, tiene la finalidad de producir plantas transgénicas (incorporando genes foráneos a una especie dada). Esto ha incrementado la investigación en cultivos de tejidos debido a que la regeneración *in vitro* ha mostrado ser el elemento crítico para que los resultados de laboratorio sean aplicados. Una vez que un protocolo de regeneración y transformación se desarrolla, la producción de plantas transgénicas se vuelve rutinario, tal y como sucede con el maíz y el tabaco (Nagl, *et al.*, 1997).

De esta manera, la habilidad de regenerar una planta fértil y completa partiendo de células seleccionadas o transformadas es la llave que abre el vasto potencial biotecnológico del cultivo de tejidos vegetales.

1.5 Regeneración

La regeneración es un proceso en el cual se reestructura o reestablece alguna parte de un organismo que haya sido dañada, removida o aislada del mismo. Este proceso es el componente más importante en las técnicas de CTV, que implica el establecimiento de condiciones óptimas de cultivo (antes mencionadas) que permitan la obtención de una planta adulta, regenerada, partiendo de una o varias células aisladas. Los órganos que pueden generarse *de novo* partiendo de cultivo de tejidos vegetales son: raíces, yemas, brotes, flores y embriones. En el proceso de regeneración se encuentra involucrado un amplio rango de factores, desde tejido-específicos hasta condiciones de cultivo, los

cuales necesitan ser optimizados y adaptados para cada especie con la que se trabaja (Doddo y Roberts,1982; Warren, 1991).

Para la obtención de plantas regeneradas por CTV existen dos vías morfológica y anatómicamente diferentes la organogénesis y la embriogénesis somática (Fig.3).

Organogénesis

En el desarrollo normal de una planta la organogénesis, proceso que involucra la formación de órganos vegetales, se presenta de manera continua en el meristemo apical del brote (SAM) y en el meristemo apical de raíz (RAM), establecidos durante las primeras etapas del desarrollo del embrión. En CTV la organogénesis implica la formación de nuevos brotes, raíces y hasta órganos florales partiendo de explantes que se han colocado en condiciones de cultivo. El desarrollo de plantas vía organogénesis se puede dividir en cuatro etapas: 1) Inducción, 2) Desarrollo, 3) Enraizamiento y 4) Aclimatación (Phillips, *et al.*,1995). Si las estructuras que se obtienen durante el cultivo son estructuras unipolares (yemas, brotes o raíces) y se forman sin que exista una fase de desdiferenciación celular (fase de callo), se le denomina organogénesis directa. En esta vía los órganos son frecuentemente formados a partir de una o varias células las cuales se dividen dando lugar a masas de células meristemáticas llamadas meristemoides, o promeristemoides si son grupos de células de menor complejidad. En la organogénesis directa la formación de yemas y de brotes precede a la de raíces, por lo que la conexión tallo-raíz debe desarrollarse posteriormente. La organogénesis indirecta implica la formación de órganos, pasando por una fase de callo; estos órganos se forman de una manera comparable a la observada en la organogénesis directa, aunque estos pueden desarrollarse dentro del callo o superficialmente, de ahí los términos exógeno y endógeno. (Esau, 1977; Bhojowani y Razda, 1989; Warren, 1991; George, 1993; Mroginiski y Kartha, 1995).

Embriogénesis somática

En la embriogénesis cigótica, el cigoto unicelular, producto de la fusión de gametos, da lugar a una estructura multicelular que obtiene una forma específica de organización celular, el embrión. En la embriogénesis somática, las células somáticas dan lugar a estructuras que recuerdan mucho a los embriones cigóticos, tanto en su estructura como en sus propiedades fisiológicas; presentan bipolaridad, un sistema provascular cerrado entre dos ápices, una autonomía respecto al tejido del explante y se encuentra "protegido" por una epidermis o protodermis, además de que las primeras hojas que se producen tienen características que son típicas de hojas cotiledonarias (Monnier, 1990). Su organización suele ser más variable que la de un embrión cigótico, y pueden existir diferencias en formas y tamaños; una de las características más importantes es que estas estructuras dan lugar a plantas completas a través de estadios de desarrollo equivalentes a las etapas características de la embriogénesis cigótica. La embriogénesis

somática directa implica la formación de embriones o tejidos embrionarios sin la intervención de una fase de dediferenciación celular del explante (callo). La embriogénesis somática indirecta implica la producción de embriones con la intervención de una fase de callo; es decir, que del conjunto de células dediferenciadas se obtienen células que optan por una vía de redeterminación morfogénica que da lugar a embriones somáticos. Estudios citológicos, histoquímicos, de ultraestructura y bioquímicos indican que las células embriogénicas son únicas aunque altamente parecidas a las células meristemáticas (difieren en contenido de proteínas y de RNAm) (Rangaswamy, 1986; Bhojowani y Razda, 1989; Garman, 1990; George, 1993; Mroginski y Kartha, 1995; Finer, 1995)

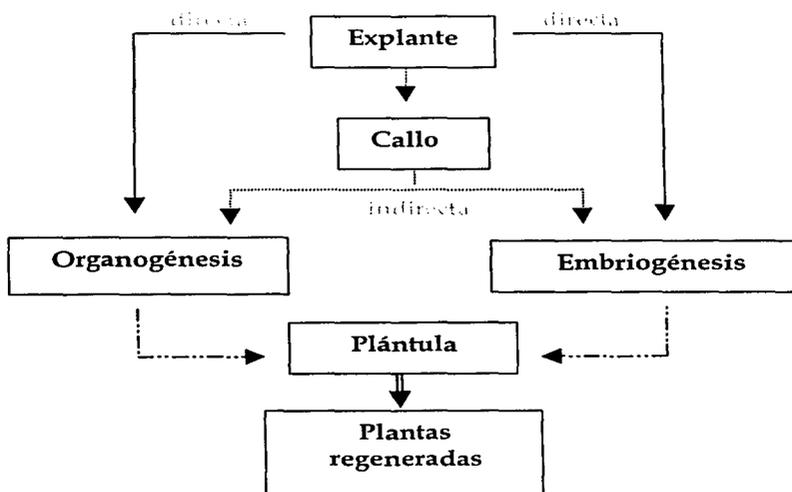


Figura 3. Vías de regeneración por CTV.

Gracias a estudios histológicos se sabe que los brotes y embriones regenerados pueden provenir de una célula o de un conglomerado o conjunto que actúan de manera coordinada, dependiendo de la especie vegetal (Phillips y Hubstenberger, 1995).

La mayoría de las plantas que son capaces de regenerar por cultivo de tejidos vegetales, lo hacen por medio de organogénesis o de embriogénesis somática, muy pocas son las que lo hacen por ambas vías (Phillips y Hubstenberger, 1995).

El tipo de regeneración que se produce está determinada por el régimen impuesto de reguladores de crecimiento, y es precisamente la aplicación de éstos, el principal control que se tiene sobre el tipo de diferenciación. Se ha encontrado, por ejemplo, que la proporción auxina/citocinina exógenas es un factor importante en el proceso de diferenciación en CTV. Así, un nivel de auxinas mayor al de citoquininas favorece la

formación de raíces, dado que la inducción de meristemos adventicios generalmente depende de un alto nivel de estas. La aplicación de niveles más alto de citoquininas favorece la formación de brotes, debido a la represión de la dominancia apical que este regulador ejerce. Sin embargo aún no se ha establecido el proceso por el cual esta relación auxina/citocinina es percibida, y aunque el mecanismo exacto que desencadena el proceso de regeneración puede variar de especie a especie, tal proporción ha mostrado ser consistente entre una gran variedad de sistemas. Por otro lado, aunado a la concentración y balance de reguladores de crecimiento, está la localización de la formación del órgano dentro del tejido (Doddo y Roberts,1982; Rangaswamy, 1986; Warren, 1991).

1.6 Regeneración del frijol *Phaseolus vulgaris* L.

Desde hace algunos años se ha visto un progreso significativo en el desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos en una gran variedad de especies de leguminosas pertenecientes a los géneros *Arachis*, *Cajanus*, *Cicer*, *Glycine*, *Lotus*, *Medicago*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Psophocarpus*, *Stylosanthes*, *Trifolium*, *Vicia* y *Vigna* (Martins y Sondhal,1984; Mroginski y Kartha,1985; Mohamed, *et al.*, 1992a y b; Xiu-Quig Li y Dermarly,1996; Christou, 1997; Nagl, *et al.*,1997; Khalafalla y Hattori, 1999).

Se han obtenido plantas regeneradas de varias especies de *Phaseolus* tales como *Phaseolus acutifolius* A. Gray, vía organogénesis (Mohamed, *et al.*,1992 a y b; Malik y Saxena,1992b; Dillen, *et al.*, 1996; Zambre, *et al.*, 1998), *Phaseolus aureus* L. (Malik y Saxena, 1992b), *Phaseolus coccineus* L. vía organogénesis (Angelini y Allavena, 1989; Santalla, *et al.*, 1998) y embriogénesis somática (Genga y Allavena, 1991; Malik y Saxena, 1992b; Angelini y Allavena, 1989), *Phaseolus polyanthus* Greenm vía organogénesis (Zambre, *et al.*, 2001) y *Phaseolus wrightii* (una especie silvestre) vía organogénesis (Malik y Saxena, 1992b), lo que nos sugiere que la capacidad de regeneración está presente dentro de éste género.

Phaseolus vulgaris L. es la especie más importante, de plantas cultivadas, dentro del género *Phaseolus*, sin embargo no es la más susceptible a regenerarse. Si bien, la regeneración con base en cultivo de meristemos y brotes axilares usando citocininas ha sido mostrada, el lograr el desarrollo de embriones y brotes regenerados, así como la obtención de un porcentaje significativo de plantas adultas ha sido el punto crucial del proceso. Así hasta el momento la mayoría de los procesos que han tenido éxito en la regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. involucran organogénesis directa (Tabla M).

El cultivo de tejidos y la regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. ha probado ser de gran dificultad, existen pocos reportes en los que se demuestre una regeneración eficiente. A esto hay que añadir el que sólo un pequeño número de los protocolos que se han reportado para la regeneración de esta especie han mostrado ser reproducibles, implicando que las metodologías que son aplicables a una variedad determinada no lo son para otras; lo que puede deberse a una importante influencia de factores genotipo

dependientes en el proceso de regeneración y el que *Phaseolus vulgaris* L. es una especie altamente polimórfica.

Autor	Explantante	Medio de cultivo	RCV	Regeneración	Notas
Crocomo, <i>et al.</i> , 1976; var. Bico de Ouro	Segmentos de hojas (5 mm ²)	Medio 67-V; extracto de semillas de frijol (1/4ml) Agar 1%	IAA (1 mg/l) Kin (4 mg/l)	Brotación vía organogénesis indirecta	Regeneraron 2 plantas de 400 cultivos callos
Kartha, <i>et al.</i> , 1981; var. Dwarf Green Skingless	Meristemos apicales de brotes	Sales de medio Murashige y Skoog (MS) y vitaminas de medio Garborg (B5); Sacarosa 3%; agar 0.8%	BA (1 µM) NAA (0.1 µM) GA (0.1 µM)	Brotos múltiples vía organogénesis directa	Obtienen plantas completas, pero no presentan datos de la eficiencia de regeneración.
Martins y Sondhal, 1984; cvs. Moruna, Firata-1 y Línea-29	Apices de brote	Sales de medio PC-L2 tiamina(5mg/l); piridoxina(1.5mg/l); Meso-nositol(50mg/l); Caseína (1g/l); Scarosa 3%	IAA (10 µM) 2,4-D (5 µM) Kin (10 µM)	Embriogénesis somática	Estructuras globulares y conjuntos celulares con un posible suspensor
McClean y Grafton, 1989; cvs. Olathe y Othello	Nodo cotiledonario (sin yemas cotiledonarias)	Medio MS/B5 Sacarosa 3% Agar 0.6%	BAP (5 µM)	Brotación múltiple vía organogénesis directa	Demuestran el origen subepidérmico de los brotes gracias a un estudio histológico.
Franklin, <i>et al.</i> , 1991; cv. Dwarf Green Stingless	Cotiledón unido a una parte eje embrionario	Medio MS L-glutamina (10mM) Sacarosa 1% Agar 0.8%	BAP (15 µM) GA (2 µM)	Brotación múltiple, vía organogénesis indirecta	Obtienen plantas adultas; no mencionan eficiencia de regeneración
Malik y Saxena, 1991; cv. Kinghorn Wax	Segmentos de peciolo	Medio MS/B5 Sacarosa 3% Gerlite 0.25%	2,4-D (1-2 µM)	Estructuras parecidas a embriones somáticos	No obtienen plantas completas
			BAP (10 µM)	Formación de brotes	Obtención de plantas adultas, más no dan información sobre la eficiencia del proceso
Malik y Saxena, 1992; cv. Kinghorn Wax	Plántulas intactas	Medio MS/B5; Sacarosa 3%; Gerlite 0.25%	BAP (80 µM) TDZ (10 µM)	Inducen un alto número de brotes en la zona del nodo cotiledonario	Eficiencia de regeneración de 70%. El estudio histológico demuestra el origen subepidérmico de los brotes
Mohamed, <i>et al.</i> , 1992 Líneas "U169", "Harris" y "PC 50"	Ejes embrionarios	Medio B5 Sacarosa 2% Agar 0.8%	BAP (5-10 µM)	Brotación múltiple	Plantas regeneradas con un alto porcentaje de eficiencia
Mohamed, <i>et al.</i> , 1992b; Líneas y Xan-159	Nodos cotiledonarios con una parte del cotiledón, sin yemas axilares	Medio MS/B5 Sacarosa 3% Agar 0.6%	BA (5 µM) TDZ (0.25 µM) CPPU (0.25µM)	Brotación múltiple vía organogénesis directa	Logran plantas regeneradas pero no mencionan la eficiencia de regeneración.
Mohamed, <i>et al.</i> , 1993 cvs. Beryl, Harris, Starlight, Tara y Xan-159	Pedícelos de hojas primarias	Medio MS ó B5 Sacarosa 2%	BA (1%) TDZ (0.5mg/l) IAA (0.25 mg/l)	Brotación múltiple vía organogénesis indirecta	Logran la regeneración de plantas no mencionan la eficiencia de regeneración

Autor	Explantante	Medio de cultivo	RCV	Regeneración	Notas
Kim y Minamikawa, 1996; cv. Goldstar	Eje embrionario	Medio MS/B5 Sacarosa 5%	Sin RCV	Brotación vía organogénesis directa	No mencionan eficiencia de regeneración
Zambre, et al., 1998; Línea Xan-159	Cotiledones	Medio MS Sacarosa 2% Agar 0.8%	TDZ (0.1 mg/l), BA (0.1 mg/l) IAA (0.05mg/l)	Brotación múltiple vía organogénesis indirecta	Plantas adultas no reportan eficiencia de regeneración
Santalla, et al., 1998; 10 diferentes genotipos	El cotiledón y una parte del eje embrionario	Medio MS Sacarosa 1% Agar 0.8%	BAP (15 µM) GA ₁ (2 µM)	Brotación múltiple vía organogénesis directa	Obtuvieron 63% eficiencia de enraizamiento
Aragão, et al., 1998; cv. Olathe	Ejes embrionarios	Sales y vitaminas MS	BAP (44.3 µM)	Brotación múltiple vía organogénesis directa	No mencionan eficiencia de regeneración
Cruz de Carvahlo, et al., 2000; cv. Carioca	Capas celulares de tejidos (TCLs)	Medio MS/B5 Agar 0.6%	TDZ (10 µM) BAP (10 µM) AgNO ₃ (10 µM)	Brotación múltiple vía organogénesis directa	Desarrollo de brotes en un alto porcentaje (100%).

Tabla 1. Regeneración de *P. vulgaris* L., diferentes trabajos de 1976 al 2000.

1.7 Regeneración de variedades mexicanas de *Phaseolus vulgaris* L.

Flores (1993) establece un protocolo de regeneración para *Phaseolus vulgaris* L. variedad Negro Jamapa partiendo de diferentes explantes: yemas y meristemas apicales con el objetivo de generar plantas de frijol libres de patógenos e incorporarlo a un modelo de certificación, así como para plantear las bases para establecer cultivo de células en suspensión y la regeneración a partir de embriones somáticos. Este trabajo establece que la sacarosa es la mejor fuente de carbono, que el germinar la semilla en fotoperiodo influye positivamente en el proceso, el éxito del uso de BAP sobre otros fitorreguladores para generar brotes, y que a altas concentraciones de este regulador los brotes no se desarrollan. Por otro lado, utiliza AIA y ANA para enraizar, lo que le permite pasar a tierra de manera satisfactoria las plantas regeneradas.

Diego (1998) implementa un protocolo de regeneración para *Phaseolus vulgaris* L. variedad Negro Jamapa, con el cual inició estudios para acoplarlo a la transformación genética vía *Agrobacterium*. Este protocolo demuestra la capacidad de BAP para la inducción de brotes múltiples. La autora establece que la concentración óptima a utilizar de este regulador de crecimiento vegetal es de 5 mg/l para la variedad utilizada. Este trabajo establece que el mejor explante es el nodo cotiledonario, propone que la orientación del explante influye en la generación exitosa de brotes y que una concentración de 50 g/l de sacarosa así como la utilización de medio MS/B5 a la mitad de su concentración normal permiten el enraizamiento eficiente de los brotes. La eficiencia de regeneración que obtiene es de 80%. Se propone que la regeneración es vía organogénesis directa.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Establecer un protocolo de regeneración *in vitro* para diferentes variedades mexicanas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un procedimiento general para la inducción de brotes múltiples en las variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano.
- Establecer las condiciones de cultivo óptimas, tales como: concentración de regulador de crecimiento, tiempo de exposición a éste, tamaño y estado fisiológico del explante, medio de cultivo (semisólido y líquido), así como la manipulación adecuada, que permitan la regeneración en *Phaseolus vulgaris* L.
- Determinar el origen y desarrollo de los brotes por medio del estudio histológico sobre las primeras etapas del proceso de regeneración.

III METODOLOGÍA

3.1 Procedencia de la semilla

Se usaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. variedades Flor de Mayo, Flor de Junio, Americano y Peruano, que fueron obtenidas de la Productora Nacional de Semillas (PRONASE).

3.2 Esterilización y selección de semilla

Las semillas fueron lavadas con detergente comercial (Extran) al 100% durante 1 min, y esterilizadas con etanol al 70% (v/v) por 1 min y sumergidas en una solución con hipoclorito de Sodio al 10% (de una solución comercial al 6%) de 5 a 10 min. Después de cada tratamiento, las semillas fueron enjuagadas de 4 a 6 veces con agua destilada estéril.

Para una germinación uniforme se seleccionaron aquellas semillas completas, equivalentes en tamaño, que presentaran una cubierta sin quebradura, y sin cambios de coloración, ni pliegues después del tratamiento de esterilización.

3.3 Condiciones de germinación *in vitro*.

Para la germinación de la semilla se usó como medio base las sales de Murashige & Skoog (MS) suplementadas con vitaminas del medio Gamborg (B5) (Anexo 2), al 50% ó 100% de su concentración, adicionado con sacarosa a 15, 20 ó 30 g/l (w/v) y N⁶-benzilaminopurina (BAP) a 0, 2.5, 5, 8, 10, 12 y 15 mg/l (Tabla 2), ajustado a un pH de 5.6 -5.7 antes de su esterilización, y solidificado con agar tipo A al 0.8% (w /v), el medio se denominó MG y resultó en 42 combinaciones diferentes. Se utilizaron frascos de vidrio (45 x 100 mm) como contenedores. Se germinaron cinco semillas por frasco a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en fotoperíodo de 16 hrs luz ($40\mu\text{einsteins}/\text{m}^2\cdot\text{s}^2$) y 8 hrs de obscuridad (Fig. 4A).

3.4 Cultivo de explantes *in vitro*.

Los explantes se obtuvieron (de 8 a 12 días de germinación) una vez que las plántulas desarrollaban una raíz vigorosa, un tallo verde mayor a 5 cm y las hojas primarias estaban, en su mayoría, libres de la testa seminal.

El explante consistió en la sección del nodo cotiledonario, cortando el hipocótilo y el epicótilo a una distancia de 5 mm aproximadamente de la zona de cotiledones, del cual fueron separados los cotiledones (Fig. 4B).

Medio de germinación	MS/B5 (%)	BAP (mg/l)	Sacarosa (g/l)
MG1	50	0	15
MG2	50	0	20
MG3	50	0	30
MG4	100	0	15
MG5	100	0	20
MG6	100	0	30
MG7	50	2.5	15
MG8	50	2.5	20
MG9	50	2.5	30
MG10	100	2.5	15
MG11	100	2.5	20
MG12	100	2.5	30
MG13	50	5	15
MG14	50	5	20
MG15	50	5	30
MG16	100	5	15
MG17	100	5	20
MG18	100	5	30
MG19	50	8	15
MG20	50	8	20
MG21	50	8	30
MG22	100	8	15
MG23	100	8	20
MG24	100	8	30
MG25	50	10	15
MG26	50	10	20
MG27	50	10	30
MG28	100	10	15
MG29	100	10	20
MG30	100	10	30
MG31	50	12	15
MG32	50	12	20
MG33	50	12	30
MG34	100	12	15
MG35	100	12	20
MG36	100	12	30
MG37	50	15	15
MG38	50	15	20
MG39	50	15	30
MG40	100	15	15
MG41	100	15	20
MG42	100	15	30

Tabla 2. Medios analizados en la germinación (MG).

El cultivo de explantes se realizó sobre el medio de inducción de brotes MIB: medio MS/B5 al 50% ó 100% de su concentración adicionado con 20 ó 30 g/l de sacarosa (w/v) y BAP 0, 2.5, 5, 8, 10, 12 y 15mg/l, lo cual resultó en 28 combinaciones. El medio se ajustó a un pH de 5.6 antes de ser esterilizado (Tabla 3). y fue solidificado con Phytigel al 0.4% (w/v),. Los explantes permanecieron en este medio de 8 a 35 días y se establecieron los tiempos para la separación de los brotes.

Medio	MS/B5 (g/l)	BAP (mg/l)	Sacarosa (g/l)
MIB1	50	0	20
MIB2	100	0	20
MIB3	50	0	30
MIB4	100	0	30
MIB5	50	2.5	20
MIB6	100	2.5	20
MIB7	50	2.5	30
MIB8	100	2.5	30
MIB9	50	5	20
MIB10	100	5	20
MIB11	50	5	30
MIB12	100	5	30
MIB13	50	8	20
MIB14	100	8	20
MIB15	50	8	30
MIB16	100	8	30
MIB17	50	10	20
MIB18	100	10	20
MIB19	50	10	30
MIB20	100	10	30
MIB21	50	12	20
MIB22	100	12	20
MIB23	50	12	30
MIB24	100	12	30
MIB25	50	15	20
MIB26	100	15	20
MIB27	50	15	30
MIB28	100	15	30

Tabla 3. Medios utilizados para el cultivo de explantes (MIB).

Los contenedores que se probaron en el cultivo de explantes fueron:

- frascos de vidrio, 45 x 100 mm
- cajas Petri de 100 X 25 mm (SIGMA; St. Luis,MO)

Los explantes, tanto en frascos (Fig. 4C) como en cajas Petri (Fig. 4D), fueron desarrollados en un cuarto de cultivo *in vitro*, a una temperatura de 25 ± 5°C, una humedad relativa de 70%, y un fotoperíodo de 16 X 8.



Figura 4. Etapas del proceso de regeneración. A: germinación de semillas estériles var. Flor de Junio, B: nodo cotiledonario como explante var. Americano, C: explantes en frasco y en caja Petri y D: medio MIB var. Peruano.

3.5 Obtención y desarrollo de los brotes.

Los brotes fueron separados cortando el explante, primero longitudinalmente siguiendo el eje embrionario (Frankling, *et al.*, 1991; Diego, 1998), y posteriormente cada mitad (denominada unidad de brotes "UB") fue dividida en dos o más partes.

Las UB se cultivaron en medio de desarrollo de brotes MDB (1-4): medio MS/B5 al 50% ó 100% de su concentración, adicionado con 20 ó 30g/l de sacarosa y llevado a un pH de 5.6 (Tabla 4).

Medio	MS/B5 (%)	BAP (mg/l)	Sacarosa (g/l)
MDB1	50	0	20
MDB2	50	2.5	20
MDB3	50	5	20
MDB4	50	8	20
MDB5	100	0	20
MDB6	100	2.5	20
MDB7	100	5	20
MDB8	100	8	20
MDB9	50	0	30
MDB10	50	2.5	30
MDB11	50	5	30
MDB12	50	8	30
MDB13	100	0	30
MDB14	100	2.5	30
MDB15	100	5	30
MDB16	100	8	30

Tabla 4. Medio utilizado para el desarrollo de Brotes (MDB).

Los contenedores que se probaron para el desarrollo de los brotes fueron:

- Frascos de vidrio (45 x 100 mm) donde se colocaron de dos a tres brotes por frasco, y se usó agar tipo A, al 0.8% (w/v), como agente solidificante (Fig. 5A)
- Cajas Petri de 100 X 25, donde se colocaron de 6 a 9 conjuntos de brotes por caja, usando Phytigel al 0.4% (w/v) como agente solidificante (Fig. 5B)
- Cajas Magenta (MAGENTA^{MT} Vessels and Accesories, GIRBCO BL[®]) las cuales presentan un flotador, una membrana de polipropileno y una tapa para intercambio gaseoso. Se colocan de 5 a 7 conjuntos de brotes en cada membrana (Fig.5C y 5D)

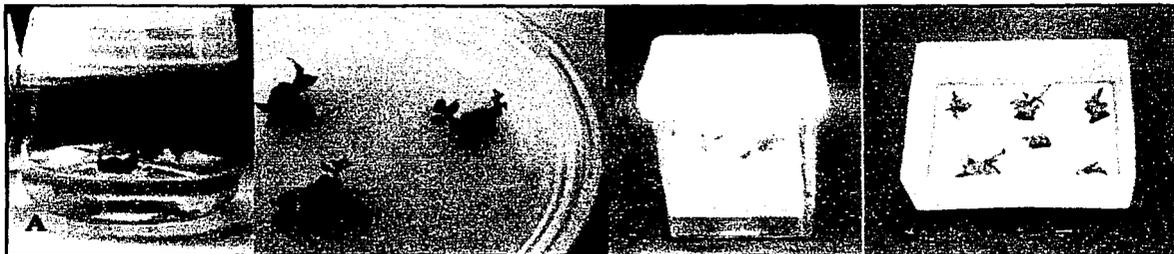


Figura 5. Contenedores usados con medio MDB. A: frasco de vidrio, B: caja Petri, C: caja Magenta con flotador y tapa para intercambio gaseoso y D: membrana de polipropileno usada como soporte en las cajas Magenta.

Las condiciones para el desarrollo de los brotes fueron las mismas que se usaron para el cultivo de explantes con el medio MIB. Los brotes fueron disectados regularmente para establecer los tiempos de separación de éstos y para permitir su desarrollo. Las UB y los brotes obtenidos fueron subcultivados en medio fresco cada tres semanas.

3.6 Enraizamiento de los brotes.

Para el enraizamiento de los brotes se utilizó el medio MS/B5 al 50 ó 100%, sacarosa a 30 ó 50 g/l y ANA 0 ó 0.5 mg/l (Tabla 5); que resultó en 16 combinaciones (MR 1- 16) Los contenedores que se usaron fueron los mismos que se usaron para el desarrollo de los brotes.

Los brotes permanecieron en el medio de enraizamiento hasta que presentaron una raíz principal vigorosa de aproximadamente 5 cm y raíces secundarias; es decir, un sistema radicular que les permitiera el ser trasplantados a una mezcla estéril de agrolita-vermiculita 1:1 (Diego, 1998).

Medio de Enraizamiento	MS/B5 (%)	Sacarosa (g/l)	ANA (mg/l)
MR1	50	30	0
MR2	50	50	0
MR3	50	30	0.5
MR4	50	50	0.5
MR5	100	30	0
MR6	100	50	0
MR7	100	30	0.5
MR8	100	50	0.5

Tabla 5. Medio utilizado para el enraizamiento (MR).

3.7 Aclimatación de los brotes enraizados.

Los contenedores que se usaron para el sustrato (agrolita/vermiculita, 1:1) fueron:

- Conos de plástico (4 x 20 cm).
- Cajas magenta con tapa para intercambio gaseoso (MAGENTA^{MT} Vessels and Accesories, GIRBCO BRL[®]).

Los brotes enraizados y colocados en conos fueron puestos en una gradilla y cubiertos con bolsas de plástico. Estos fueron colocados en un cuarto a 25 ± 5 ° C, con una humedad relativa de 60%, y con fotoperíodo de 16 X 8 hrs. Las plántulas, tanto en cono como en caja Magenta, fueron regadas cada tercer día alternando agua y solución nutritiva de Hogland (Anexo 3).

Las plantas que sobrevivieron a esta etapa fueron transplantadas a macetas (15 x 11 cm) con agrolita /vermiculita (1:1) como sustrato. Para la aclimatación de las plantas las macetas fueron cubiertas con bolsas de plástico y llevadas a una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 ± 5 °C, con una humedad relativa de 58%, y fotoperíodo de 12 hrs. Las condiciones de riego fueron las mismas que se usaron para el enraizamiento. Las macetas se mantuvieron en estas condiciones de una a tres semanas y después fueron llevadas al invernadero.

3.8 Condiciones de invernadero.

Una vez que las plantas fueron llevadas al invernadero, se les regó cada tercer día, alternando agua y solución nutritiva (Tabla 6), y se les proveyó de una guía aérea, que consistió en un palo de madera de 60 cm y/o hilo cáñamo. Las plantas se mantuvieron a estas condiciones (temperatura de 20 a 30 °C, una humedad relativa de 60% a 70%, y luz de día) hasta la floración y la cosecha de semilla.

3.9 Análisis estadístico.

Para la evaluación de los datos obtenidos se utilizaron dos pruebas estadísticas: la Prueba "t de Student", con el uso del programa Sigma Plot (versión 2.0), y la prueba no paramétrica "Wilcoxon-Man-Whitney Rank Sum Test". Se comparó el efecto de las concentraciones de BAP utilizadas en el proceso de regeneración.

3.10 Análisis de la progenie.

Una vez que la vaina madura se colecta y se rotula, cuando ésta se ha secado la semilla es almacenada en sobres de papel, llevando la relación de la concentración de regulador usada, número de experimento y de repetición.

Para el análisis de la progenie se escogieron semillas de tamaño uniforme y que no presentaran quebraduras en la testa, las cuales fueron germinadas junto con semillas provenientes de plantas del lote parental (no regeneradas).

A diferencia del método de germinación utilizado para la germinación *in vitro*, la semilla se esterilizó de la siguiente manera: se enjuagó la semilla con agua corriente de dos a tres veces, se esterilizaron en una solución de hipoclorito de Sodio al 10% (de una solución comercial al 6%) durante 10 a 15 min; posteriormente las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril, 6 a 10 veces para eliminar residuos de cloro.

Las semillas fueron germinadas sobre papel húmedo en charolas de metal, a 25 ± 5 ° C, en obscuridad durante cuatro días, después de los cuales fueron plantadas en macetas con agrolita/vermiculita (1:1) y puestas en las condiciones de invernadero antes mencionadas.

Los parámetros que se tomaron en cuenta para el análisis de la progenie fueron: el porcentaje de germinación, la sobrevivencia a las condiciones de invernadero y el crecimiento de las plantas de ambos lotes.

3.11 Análisis histológico.

Se colectaron explantes en diferentes etapas del desarrollo (0, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 días de cultivo): sin reguladores del crecimiento, en medio MIB y MDB.

Para la fijación de las muestras se probaron dos protocolos:

Fijación 1. Fijación con paraformaldehído y glutaraldehído.

El material vegetal fue fijado en una solución de paraformaldehído al 1%, glutaraldehído al 2 % y buffer fosfatos 50 mM a pH 7.2. Utilizando vacío a intervalos de 30 min. Las muestras fueron enjuagadas en buffer fosfatos y deshidratadas con etanoles

graduales (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 96% y 100% durante dos horas cada uno) posteriormente se pasaron a mezclas de etanol-xilol (3:1, 1:1 y 1:3) y a xilol al 100% por 12 hrs; el xilol fue substituido por mezclas xilol-paraplast (2:1, 1:1, 1:2) por 12 hrs, y al final por paraplast puro, los cambios se hicieron a una temperatura de 55-60 °C, posteriormente se hicieron 4 cambios (en 4 días) de paraplast puro a 55-60 °C. Hecho el último cambio de paraplast las muestras fueron puestas en moldes de cartón (cúbicos) y se colocaron a -4°C. Los cortes, de 7 a 10 µm de espesor, se obtuvieron mediante el uso de un microtomo de rotación de (Lara, M., *com. per.*).

Fijación 2. Fijación en FAA (formol, ácido acético, alcohol etílico/1: 0.5: 5)

El material vegetal fue fijado en FAA por un tiempo mínimo de 48 hrs, después del cual se procedió a deshidratarlas con etanoles graduales (30%, 50%, 70%, 86%, 96%, 100% y 100%, durante 30 min, cada uno); el etanol fue substituido por xilol al 100%, y éste, posteriormente, por mezclas de xilol-paraplast (2:1, 1:1, 1:2, por 24 hrs) y por último por paraplast, manteniendo las muestras en una estufa a una temperatura de 55 a 60 °C. Los cortes se hicieron con un microtomo de rotación a 7- 10 µm de espesor (López-Curto, *et al.*, 1998).

Una vez obtenidos los cortes se procedió a la desparafinación, metiendo las laminillas en la estufa a 60°C durante 20 a 30 min, posteriormente fueron lavadas con xilol puro (3 veces). Después de eliminar la paraplast los cortes fueron hidratados en una serie etanólica: 100%, 100%, 96%, 86%, 70%, 50%, 30% y agua, durante 30 min cada uno.

Se realizaron dos tipos de tinciones:

Azul de toluidina O. Los cortes fueron hidratados hasta agua y teñidos con azul de Toluidina (0.5%) por 2min. Se lavó el exceso de colorante con agua corriente, y se procedió a deshidratar las muestras en una serie etanólica (30%, 50%, 70%, 86%, 96% y 100%, por 30 min cada uno) y xilol puro, después de lo cual fueron montadas con Permout (López, L. *com. per.*)

Safranina (metilcelosolve)-verde rápido (metilcelosolve). Los cortes fueron hidratados hasta etanol al 96%, y teñidos en safranina (metilcelosolve) por 24 hrs mínimo. Se lavó el exceso de safranina con agua corriente y se procedió a pasar los cortes por las siguientes soluciones: etanol al 96% y ácido pícrico (0.95:0.5); etanol al 96% más amoniaco; etanol al 100%; verde rápido, aceite de clavo, etanol al 100%, metilcelosolve (0.05:0.33:0.33:0.33); aceite de clavo, etanol al 100% y xilol puro (5:2.5:2.5), por último los cortes fueron puestos en xilol absoluto y montados con bálsamo de Canadá (López-Curto, *et al.*, 1998).

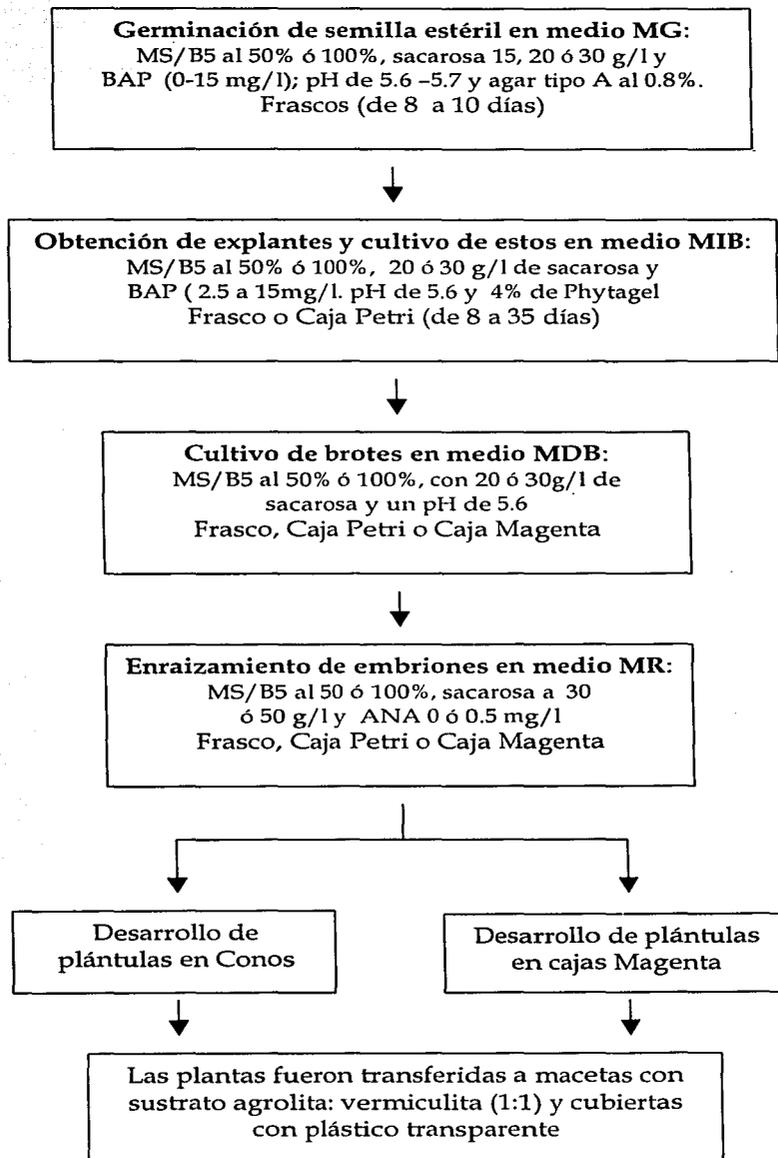


Figura 6. Diagrama metodológico del proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. variedades Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y peruano

IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Germinación *in vitro*

Las semillas permitieron la obtención de plántulas vigorosas; el porcentaje de viabilidad resultó diferente para cada variedad, siendo del 75% para la variedad Americano, 80% para Flor de Mayo, y del 90% para Flor de Junio y Peruano.

La germinación no se vio afectada al usar el medio MG al 50 o al 100% de su concentración, y no se encontraron diferencias al utilizar 15, 20 y 30 g/l de sacarosa, por lo que se decidió continuar los experimentos con las concentraciones más bajas. Se estableció un tiempo óptimo de germinación de 10 días para las cuatro variedades estudiadas, debido a que después de este periodo las plántulas mostraron adelgazamiento y ennegrecimiento del epicotilo y las hojas primarias presentaron fenolización. Tomando en cuenta el patrón de desarrollo bajo estas condiciones, el tratar de conseguir una producción de brotes, yemas o callo partiendo de plantas intactas, como lo hacen Malik y Saxena (1992) no es viable.

A los 10 días después de la germinación, las semillas sin tratamiento dan lugar a plántulas típicas con una raíz primaria, el brote con las hojas cotiledonarias, un par de metáfilas y en el ápice del brote un meristemo apical (SAM) rodeado por catáfilas; en la axila de cada cotiledón se encuentra una yema axilar que es apenas visible (Fig.7A-1). Las plántulas obtenidas de semillas germinadas en medio MG presentaron un desarrollo diferente, que consistió en un tallo engrosado y reducido en altura, con raíces primarias cortas y gruesas, que mostraron inhibición en el crecimiento de raíces secundarias (Fig.7A-2 y 7A-3); las yemas axilares cotiledonarias presentaban un mayor desarrollo. Estos datos evidencian la acción de BAP en la reducción de la dominancia apical, lo cual estimula el desarrollo de meristemos axilares y tiene acción inhibitoria en el desarrollo de la raíz, fenómeno que ya ha sido reportado en *P. vulgaris* L. (Mohamed, *et al.*, 1992).

4.2 Cultivo de explantes y de brotes

Se observó que la orientación del explante sobre el medio influye en la inducción y desarrollo de los brotes, debido a que si el explante se colocaba de manera basipétala se formaba un callo en la base éste y brotes en las zonas de las yemas cotiledonarias, en contraste, si el explante se colocaba de manera inversa se obtenía una mayor producción de callo y menor número de brotes. Este efecto fue observado previamente por Frankling, *et al* (1991), Malik y Saxena (1992a) y por Diego (1998). La razón por la cual la orientación afecta la obtención de brotes podría ser la influencia ejercida por el tejido vascular sobre el sistema, dada la polaridad intrínseca presente en el tejido con respecto al transporte de sustancias, entre ellas los RCV (Warren, 1991); donde es importante señalar que el movimiento de RCV ha mostrado ser parte esencial en la señalización posicional que regula el desarrollo vegetal (Bryant y Chiante, 1997).

En cuanto al tipo de contenedor, se encontró que se pueden cultivar tres explantes máximo por cada 40 ml de medio en frasco de vidrio, mientras que en caja Petri se cultivan nueve explantes máximo por cada 45 ml de medio. Esto indica que el uso de cajas Petri permite cultivar mayor número de explantes por cantidad de medio. Se observó, de manera cualitativa, que la forma y el color de la caja Petri influyen en la cantidad, y quizá en la calidad de luz que los explantes reciben y por lo tanto en su desarrollo. Este aspecto es de gran importancia debido a que se ha encontrado que la luz controla el desarrollo vegetal (fotomorfogénesis) con respecto a la expresión de genes, diferenciación celular o subcelular y la organogénesis (Bhojowani y Razda, 1989; von Arnim y Deng, 1996); además de que se ha descubierto que en *P. vulgaris* al aumentar la cantidad de luz se incrementa el crecimiento de tallo, hojas, pecíolos y raíces, además de que se elevan los niveles endógenos de citocininas (Hammerston, *et al.*, 1998). Dado lo anterior se decidió utilizar la caja Petri para el cultivo en medio MIB.

En cuanto a la concentración del medio no se encontró diferencia en la sobrevivencia de los explantes, sin embargo la apariencia de los explantes resultó ser más vigorosa cuando se cultivaban en medios con MS/B5 al 100%.

Se han realizado varios trabajos en los que se ha demostrado que BAP tiene efecto promotivo en la generación de brotes en frijol (Mroginski y Kartha, 1985; Nagl, 1997). Al realizar el barrido de las concentraciones de BAP se encontró que éste afecta marcadamente la habilidad de los explantes para producir brotes, lo cual ya se había visto con anterioridad (McClellan y Grafton, 1989; Malik y Saxena, 1991; Mohamed, *et al.*, 1992 a y b); cuando se aumentaba la concentración de BAP también lo hacía la cantidad de yemas y de brotes, sin embargo se reducía la capacidad de desarrollo de éstos y en especial el enraizamiento (Fig. 7B y 7C), lo cual concuerda con la hipótesis de que altos niveles de citocininas llevan al desarrollo de brotes e inhiben el de las raíces (Warren, 1991; Mok y Mok, 2001). Dado lo anterior se decidió trabajar sólo con las concentraciones 2.5, 5 y 8 mg/l (Tabla 7).

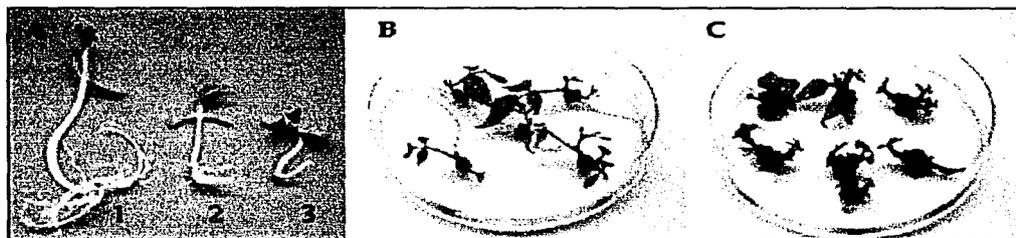


Figura 7. Germinación y cultivo de explantes en *P. vulgaris* L. A- Plántulas a los 10 días de germinación: 1) sin BAP, 2) BAP a 5 mg/l, 3) BAP a 8 mg/l variedad Peruano. B- Explantes cultivados sin BAP durante 1 semana y C- Explante cultivados en BAP (8 mg/l) por 1 semana, variedad Flor de Mayo.

BAP (g/l)	Respuesta del cultivo
0	Sólo se observa un crecimiento de las yemas axilares cotiledonarias. La mayoría de los explantes forman raíces. No hay brotación múltiple.
2.5	El explante muestra un aumento general en grosor. Baja producción de callo en la base del explante. Las yemas cotiledonarias presentan un desarrollo evidente y se pueden observar más de una en cada UB. El tamaño de las hojas de los brotes varía. Se presenta la formación de raíces en las UB y en brotes aislados.
5	Explante engrosado. Aumento en la producción de callo en la base del explante. Se pueden ver un aumento en el número de yemas axilares. Las UB presentan formación de callo, yemas y brotes. Se producen raíces.
8	Explante engrosado. Mayor producción de callo en la base del explante; y un mayor desarrollo de las yemas axilares. Las UB forman callo en la zona de contacto con el medio de cultivo. Hay un mayor ennegrecimiento de los tejidos especialmente de tallo y hoja. Hay un aumento en el número de yemas y brotes por UB. Formación de raíces.
10	Explante engrosado. Mayor producción de callo en la base del explante y de yemas axiales. Ennegrecimiento del explante. Las UB muestran un mayor número de yemas pero muestran menor número de brotes, la mayoría de las UB y brotes aislados no sobreviven y pocas producen raíces.
12	Explante engrosado. Mayor ennegrecimiento y producción de callo en el explante. Un mayor aumento en la producción de yemas con poco desarrollo foliar. No sobreviven a la separación.
15	Explante engrosado. Producción de callo y ennegrecimiento de éste y del explante. Aumento en la producción de yemas con poco desarrollo foliar. No sobreviven a la separación.

Tabla 7. Efecto de la concentración de BAP en la respuesta morfogenética de los explantes y UB cultivados en medio MIB y medio MDB.

Se sabe que tanto la concentración como el tiempo de exposición al RCV influyen en la obtención de brotes. Los tiempos para el aislamiento de los brotes se establecieron conforme a la apariencia de éstos y de los explantes. Se seleccionaron los explantes que no presentaban una apariencia café en la base y/o aquellos cuyos brotes no mostraban ennegrecimiento de tallo y hojas, aunque que éste no se podía evitar, en su totalidad. El color café y el ennegrecimiento se deben generalmente a la presencia de compuestos fenólicos que el material vegetal produce, y si bien el cortar el tejido implica la oxidación de muchos de estos compuestos, éstos también pueden ser producidos como respuesta al estrés ocasionado por la exposición al RCV exógeno (Hall, 1999); de esta manera, si se acortaban los tiempos de exposición al RCV también se veía reducida la oxidación del tejido vegetal.

Los explantes fueron cultivados en medio MIB de 2 a 4 semanas y se establecieron los tiempos de cultivo, siendo de 13 días para Americano, 15 días para Flor de Junio y de 10 para Flor de Mayo y Peruano, tomando como tiempo cero (T0) el día de la obtención del explante. Los medios en los que se produjeron mayor número de brotes fueron MIB6, MIB8, MIB10, MIB12, MIB14 y MIB16.

Los brotes se presentaron en conjuntos, situados a partir de las yemas cotiledonarias. Generalmente dentro del conjunto de brotes uno o dos centrales se desarrollan y los brotes asociados permanecían latentes. Los explantes fueron cortados en UB, y estas se cultivaron en medio MDB, después de 10 a 15 días, dependiendo de la variedad de frijol, se buscó separar lo más posible los conjuntos de brotes para que se permitiera el desarrollo de un mayor número de ellos. Como brote desarrollado se tomó a aquel que presentara de uno hasta 5 trifolios vigorosos.

El número de brotes que se desarrollaron utilizando medio líquido (en caja Magenta) fue mayor en un 33 % para la variedad Flor de Mayo, y en un 7% para la variedad Peruano sobre lo obtenido en medio sólido (frasco y caja Petri). Mientras que para las variedades Americano y Flor de Junio, el uso de medio líquido permitió el desarrollo de los brotes, ya que en pruebas realizadas con medio sólido el conjunto de yemas y brotes en estas variedades se fenolizaban, engrosaban y la mayoría no sobrevivían la separación, por lo que el medio sólido ya no fue usado para estas variedades en la pruebas de enraizamiento. La eficiencia que se obtiene puede deberse a que el uso de medio líquido permita una mejor absorción de los nutrientes por parte de tejido, y que el contenedor (caja Magenta con tapa miliporo) facilite un mayor intercambio de gases con el exterior permitiendo un mejor desarrollo de los brotes (Demeester, *et al.*,1995) Warren, 1991). Por lo tanto se decidió que el medio líquido y la caja Magenta con tapa miliporo eran las mejores condiciones para el desarrollo de los brotes.

Para las variedades Americano, Flor de Junio y Peruano el medio que permitía un mejor desarrollo de los brotes fue el MDB13, mientras que para Flor de Mayo fue el medio MDB5. Se ha discutido ampliamente respecto a sí el BAP es requerido o no para la inducción de brotes y para su posterior desarrollo, tomando en cuenta que pueden estar involucrados factores genotipo y explante dependientes, la eficacia de BAP para inducir la formación de brotes en frijol ya ha sido demostrada y se ha propuesto que en la fase para el desarrollo de los brotes la concentración de BAP debe de reducirse y que debe de suprimirse si es que se quiere lograr enraizamiento (McClellan y Grafton, 1989; Mohamed, *et al.*1992a; Malik y Saxena, 1992; Mohamed, *et al.* 1993; Diego, Zambre, *et al.* 1998; E. 1998; Cruz de Carvahlo, *et al.*,200; MoK, y Mok, 2001). Por lo que, el tratamiento con BAP se limitó a la geminación (pretratamiento) y a la fase de inducción de brotes o cultivo de explantes.

En cuanto a la respuesta a la concentración de sacarosa existen pocos trabajos en los que se mencione (Mohamed, *et al.*1993; Diego, 1998), sin embargo se sabe que la sacarosa

tiene un papel importante en la diferenciación celular en frijol (Bhojwani y Razda, 1989) y en el desarrollo vegetal en general (McIntyre, 2001). Se ha encontrado que a altas concentraciones de azúcares se puede inhibir la fotosíntesis, que los azúcares pueden regular la actividad transcripcional de ciertos genes, que están relacionados con la actividad meristemática, con el almacenamiento de proteínas y con el desarrollo vegetal; el mecanismo por el cual las plantas censan y "responden" a los azúcares aún no se encuentra del todo entendido, sin embargo, se sabe que tiene importantes funciones durante todo el ciclo de vida de una planta, y que pueden influir sobre la expresión génica de manera similar a la de los fitorreguladores; además de que también representan un factor osmótico que afecta la morfogénesis (Smeekens, 2000; McIntyre, 2001).

4.3 Enraizamiento de brotes y aclimatación de brotes enraizados

Se observó que la aplicación de ANA no tuvo efecto significativo sobre el enraizamiento de los brotes, en ninguna de las cuatro variedades. También se encontró que las condiciones que se utilizaron para el desarrollo de los brotes eran idóneas para su enraizamiento, obteniéndose raíces secundarias con un menor ennegrecimiento, y tanto éstas como la raíz principal presentaban abundancia de pelos radiculares; si bien el uso de auxinas es ampliamente utilizado para la inducción de la formación de raíz, en frijol se ha encontrado que las raíces que se forman sin la presencia de RCV exógenos son las que sobreviven al paso de las plántulas a condiciones de sustrato (Zambre, *et al.* 1998; Diego, 1998; Santalla, *et al.*, 1998). También se observó que el uso de medio líquido aumenta el enraizamiento en un 25.5% para la variedad Peruano, y en un 14.5% para la variedad Flor de Mayo. El medio líquido facilitó el proceso ya que se puede manipular a la plántula de manera sencilla evitando el daño de raíces ocasionado al limpiarlas de residuos de agar, y en el paso a medio nuevo lo que se manipula es la membrana de polipropileno y no las plántulas, lo que evita daños mecánicos a éstas. Por lo que se decidió utilizar los medios MDB5 y MDB13 tanto para el desarrollo de los brotes como para el enraizamiento para las cuatro variedades de frijol utilizadas.

Para la adaptación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones de sustrato (agrolita/vermiculita) se encontró que el uso de caja Magenta favoreció al proceso aumentando la sobrevivencia de las plántulas con respecto a la obtenida con el uso de cono (Fig. 8). El proceso se pudo ver favorecido debido a que las cajas Magenta con tapa miliporo (Fig. 9B) permiten un intercambio gaseoso con el medio exterior, lo que implica, por un lado, una humedad menor a la observada en frasco y más cercana a la de la cámara de cultivo, lo que evita una hiperhidratación de los tejidos y ayuda a una formación normal de cutícula en las plantas regeneradas, involucrando un cambio menos dramático en la transpiración, el cual se observaba al utilizar cono (Fig. 9A). El intercambio gaseoso también lleva a que la concentración de dióxido de carbono sea mayor, lo cual contribuye a estabilizar el comportamiento de la fotosíntesis en las plántulas (Warren, 1991; Demeester, 1995).

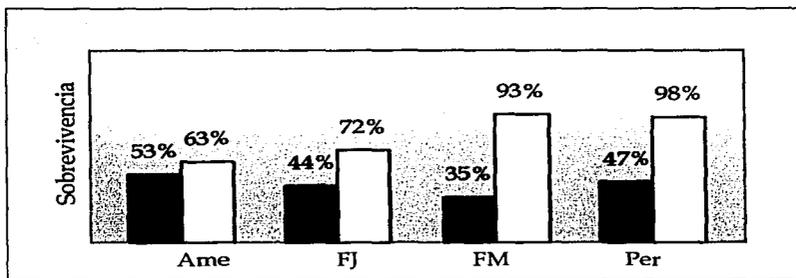


Figura 8. Supervivencia de brotes enraizados de *P. vulgaris* L. al paso de condiciones *in vitro* a sustrato en maceta usando cono (barras negras) y caja Magenta (barras blancas). Americano (Ame), Flor de Junio (FJ), Flor de Mayo (FM) y Peruano (Per). Datos obtenidos de tres repeticiones para cada variedad.

Al comparar el uso de cono y de caja Magenta en el paso a condiciones de invernadero (Fig. 9F) se observó que este se dió en tiempos más cortos (dos semanas tiempo máximo) con la caja, las plantas se ven menos estresadas y se secan sólo alrededor del 5% para las cuatro variedades (Fig. 9C). La mayoría de las plantas obtenidas mostraron una floración precoz asincrónica, de la misma manera la fructificación también fue asincrónica (Fig. 9D y 9E).

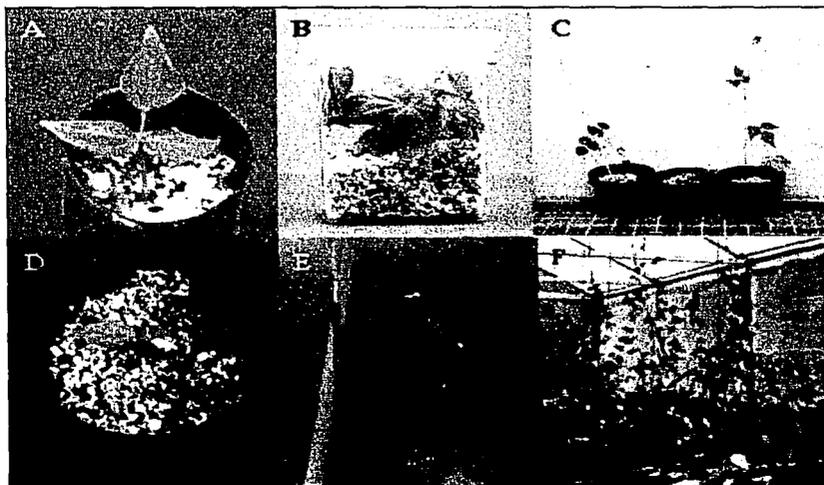


Figura 9. A, plántula en cono; B, planta en caja Magenta; C, plantas en maceta dentro de la cámara de crecimiento; D y E, planta regenerada que muestra una floración precoz y asincrónica; F, plantas en condiciones de invernadero.

Con base en el número de brotes desarrollados por explante, en la viabilidad de éstos y en la obtención de plantas adultas, no se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones usadas de BAP (Tabla 8), por lo que podemos llegar a decir que para la

producción de brotes múltiples en estas variedades de frijol se puede utilizar cualquiera de estas concentraciones, o bien cualquier otra que caiga dentro del rango que éstas establecen, éste comportamiento se ha observado con anterioridad (Mohamed, *et al.*, 1992^a; Nagl, *et al.*, 1997). Se debe tomar en cuenta que los cultivos de tejidos no responden a concentraciones absolutas de RCV, sino más bien a concentraciones relativas, y que el efecto que produzca la concentración de un RCV dado puede deberse por ésta misma, por la interacción con otro(s) RCV, exógeno(s) o endógeno(s), (Warren, 1991) y con factores “no hormonales” (McIntyre, 2001) y por el genotipo (Lutova, *et al.*, 1994).

Con base en los resultados finales del proceso de regeneración y los resultados cualitativos, que se refieren al vigor de los brotes y de las raíces, se propone utilizar en el protocolo de regeneración una concentración e 8mg/l de BAP para la variedad Americano, 2.5 mg/l para Flor de Junio y una concentración de 5 mg/l para Flor de Mayo y Peruano.

Variedad	BAP (mg/l)	Explantos totales	Brotos Totales	No. de brotes por explante	Brotos enraizados	Plantas adultas	Eficiencia de enraizamiento (%)	Eficiencia de regeneración (%) a
Americano	2.5	64	98	1.54	53	37	54.08	57.81
	5	81	146	1.8	64	45	43.8	55.55
	8	60	112	1.86	67	38	59.8	63.33
Flor de Junio	2.5	69	120	1.7	75	51	62.16	73.9
	5	82	152	1.85	93	55	67.1	67.07
Flor de Mayo	2.5	85	154	1.81	61	47	39.6	55.29
	5	95	207	2.17	92	84	40.57	88.42
Peruano	5	144	367	2.54	85	76	23.2	52.77
	8	120	257	2.14	48	43	18.6	35.83

Tabla 8. Resultados finales del proceso de regeneración en *P. vulgaris* L. variedades Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano. Datos obtenidos de cuatro repeticiones para la variedad Peruano y tres repeticiones para las demás variedades.

a. Total de plantas respecto al total de explantes usados.

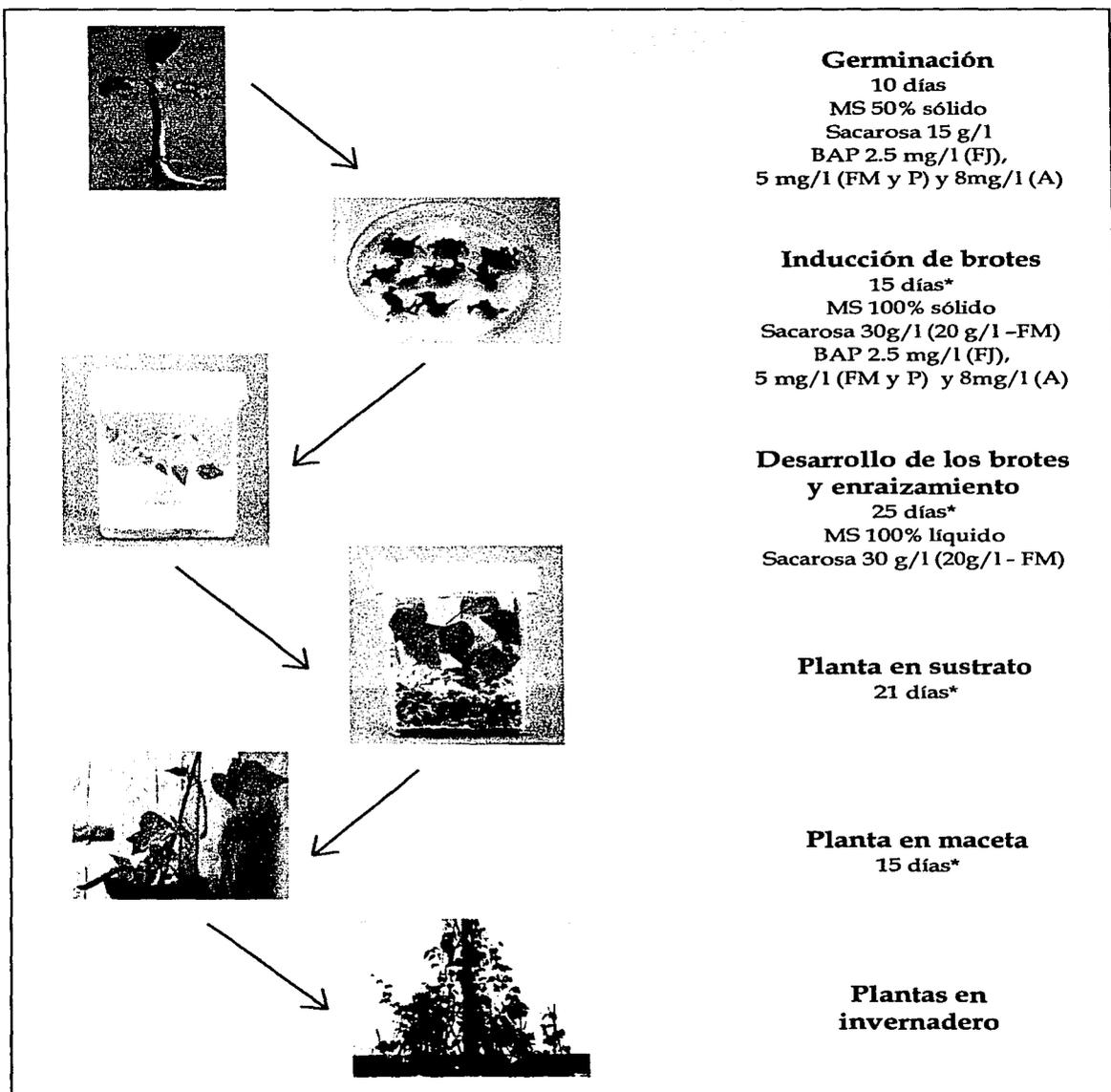


Figura 10. Estrategia de regeneración para las variedades Americano (A), Flor de Junio (FJ), Flor de Mayo (FM) y Peruano (P) de *P. vulgaris* L.

* Tiempo máximo

4.4 Análisis de la progenie

El porcentaje de germinación de la progenie fue del 95% para Americano, 78% para Flor de Junio, 100% para Flor de Mayo y 90% para la variedad Peruano. El porcentaje de plantas que llegaron a dar flores y semillas fue del 89% para Americano, 78% para Flor de Junio, 91% para Flor de Mayo y 80% para Peruano.

El crecimiento de las plantas de la F1 fue uniforme y equivalente al de las plantas del lote parental, como se denominó al lote del cual se obtuvieron las plantas donadoras de explantes.

Tanto la floración como la fructificación de la F1 fueron sincrónicas, y no se observó diferencias en cuanto al color de la flor, color y tamaño de las vainas y en el color y tamaño de la semilla al compararla con el lote parental.

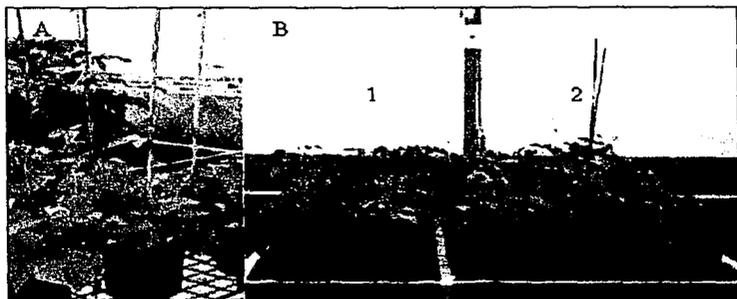


Figura 11. Análisis de la progenie. A, variedad Flor de Mayo; B, 1) plantas provenientes del lote parental 2) F1, variedad Peruano.

4.5 Análisis histológico

Los protocolos que dieron mejores resultados para el estudio histológico del proceso de regeneración fueron: la fijación con FAA y la tinción con safranina-verde rápido en metilcelosolve. El análisis histológico sólo se realizó en las variedades Flor de Mayo y Peruano, debido a que cuando se comenzaron las pruebas de fijación ya se habían obtenido resultados positivos en la regeneración en estas variedades.

Al analizar los cortes se encontró que el explante, el cual consiste de un segmento de hipocótilo de 0.5 a 1.0 cm (Fig. 4B) en donde se encuentra la zona del nodo cotiledonario, del cual fueron separados los cotiledones y que contiene las yemas axilares cotiledonarias, presenta a nivel estructural una médula flanqueada por los haces vasculares, el córtex y la epidermis, es decir, que presenta los sistemas de tejidos propios del cuerpo primario de la planta: sistema vascular, sistema fundamental y sistema dérmico. Tanto la hoja cotiledonaria como la yema axilar tienen conexiones con los haces

vasculares provenientes del cuerpo primario de la planta (Fig. 12A y 13A). Se puede observar el corte de el pecíolo del cotiledón y el tejido vascular del hipocótilo unido al tejido prevascular de la yema axilar cotiledonaria. La diferencia entre el explante proveniente de una plántula germinada sin tratamiento (Fig. 12A y 13A) y el proveniente de una germinada en presencia de BAP (Fig. 12B y 13B) radica en que este último presenta un engrosamiento general del cuerpo primario de la planta (aumento de volumen) y un desarrollo evidente de las yemas axilares, las cuales presentan la generación de más estructuras foliares y de nuevos meristemos. Estos resultados evidencian la influencia de BAP sobre el desarrollo vegetal, inhibiendo la dominancia apical, limitando el crecimiento de la planta, promoviendo el desarrollo de yemas axilares e interviniendo en la generación de nuevos brotes.

Durante el tiempo de cultivo en medio MIB se pudo observar el proceso de desarrollo de las yemas axilares cotiledonarias. Desde los primeros días de cultivo de los explantes (2, 3 y 5 días) ya se presentaban brotes desarrollados, y trazas de sistemas vasculares maduros, lo que pudo deberse a la germinación de la semilla en presencia de BAP (Fig. 12C y 13C). Se consiguió advertir como ocurrió la proliferación masiva de la yema axilar cotiledonaria, la formación de nuevos meristemos cubiertos de primordios foliares (Fig. 12E) y el desarrollo de sistemas vasculares, en su mayoría provenientes de la yema axilar cotiledonaria (Fig. 12D y 13D). El proceso de desarrollo de la yema axilar cotiledonaria, de brotes, de formación de yemas y nuevos meristemos es recurrente (Fig. 12F), siendo evidente que conforme pasa el tiempo de cultivo, si bien se puede llegar a presentar la dominancia de un brote (Fig. 12G, 12H, 12I y 13E), ello no implica que se evite el desarrollo y aparición de nuevos meristemos y primordios foliares, además de que se observan zonas de células meristemáticas típicas y sistemas vasculares maduros y en desarrollo que unen a los nuevos brotes y yemas al tejido vascular de la yema axilar cotiledonaria (Fig. 12J y 13F). En general, el sistema vascular de los brotes más desarrollados se encuentra conectado al del explante, pero también nos encontramos con la formación de yemas y nuevos brotes que no presentan conexión con tejidos vasculares preexistentes (Fig. 12K y 12L). Se puede decir que se está ante la presencia de una brotación múltiple, habiendo brotes que se desarrollan de meristemos preexistentes, que en este caso se denominan brotes axilares, y brotes provenientes de meristemos formados de novo, llamados brotes y yemas adventicias. Cabe mencionar que la formación de brotes es directa, es decir, por medio de una organogénesis directa, sin la formación de callo (Fig. 12M, 12N, 12O, 13G, 13H y 13I).

Aun después de que se dio la primera separación de brotes, obteniendo las UB y cultivándolas en MDB, se observo que continuaba el desarrollo de los brotes, la generación de meristemos y la diferenciación de primordios foliares y de haces vasculares (Fig. 12P, 12Q, 12R, 13J, 13K, 13L y 13M). Se puede decir que la producción de yemas y brotes, tanto axilares como adventicios, es un proceso continuo, aún después de que BAP ya no está presente en el medio de cultivo (Fig. 13N y 13O).

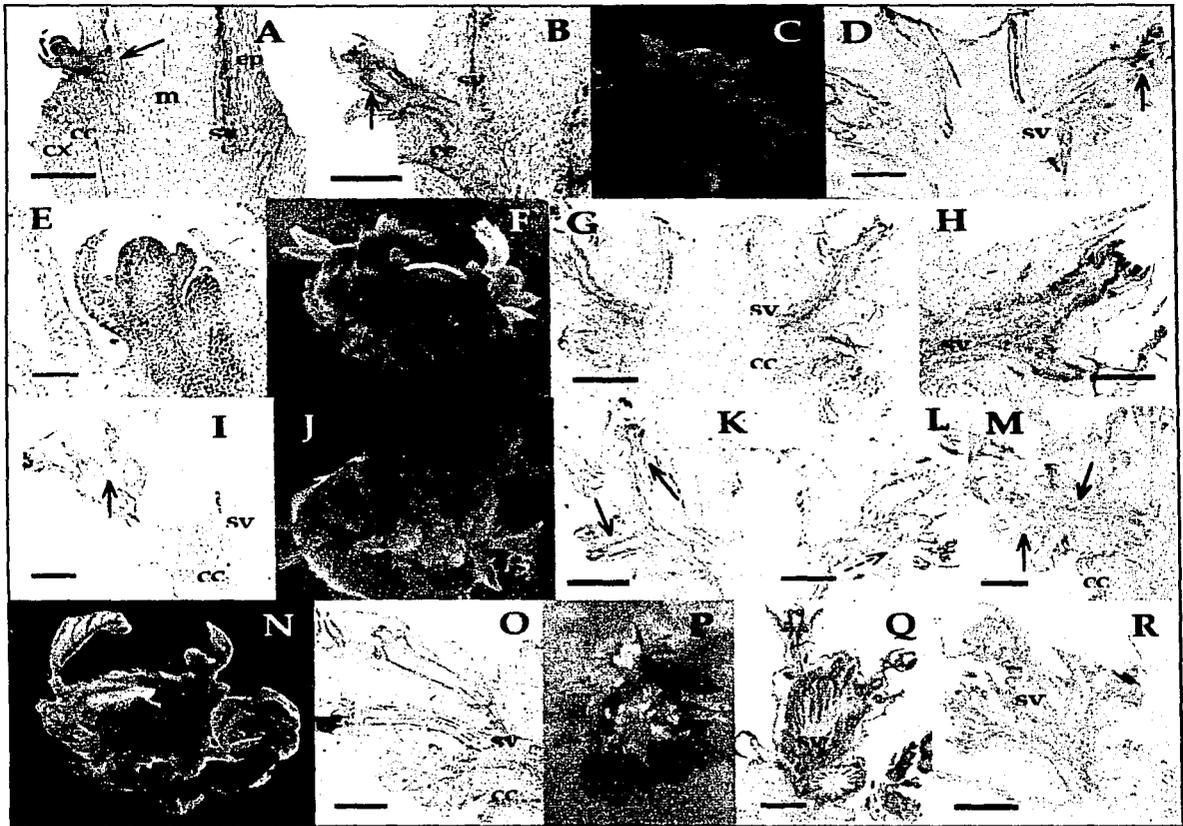


Figura 12. Análisis histológico de la regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Flor de Mayo. m= médula; sv= sistema vascular, cx= córtex; ep= epidermis; cc= corte del peciolo del cotiledón. La barra indica 100µm en A, B, D, G, I, K, L, M, O, Q y R; 500µm en H y 100µm en E.

- A. Corte longitudinal de un explante obtenido de una plántula germinada sin tratamiento (T0) que muestra una yema axilar cotiledonaria (→).
- B. Corte longitudinal de un explante proveniente de una plántula germinada en medio MG13 (T0) que muestra una yema axilar cotiledonaria (→).
- C. Yema axilar cotiledonaria a los 2 días de cultivo en medio MIB10, que muestra nuevos meristemos.
- D y E. Corte longitudinal de un explante cultivado en MIB10 por 2 días, que muestra el desarrollo de la yema axilar.
- F. Explante cultivado en MIB10 durante 3 días.
- G y H. Corte longitudinal de un explante a los 3 días de cultivo en MIB10.
- H. Corte de una yema axilar cotiledonaria de un explante cultivado en MIB10 por 3 días.
- I. Brotes axilares (→) en un explante cultivado por 5 días en medio MIB10.
- J. Explante cultivado en medio MIB10 por 5 días.
- K y L. Cortes longitudinales de un explante a los 5 días de cultivo en MIB10, se observan yemas axilares (- - →) y adventicias (→).
- M. Corte longitudinal un explante cultivado en MIB10 durante 10 días.
- N. Explante cultivado en MIB10 por 10 días, se pueden observar sistemas vasculares en diferentes etapas de desarrollo (→).
- O. Corte longitudinal de brotes axilares de un explante cultivado en MDB por 5 días.
- P. Unidad de brote obtenida a los 15 días de cultivo del explante en MIB10.
- Q y R. Cortes longitudinales de UBs cultivadas en MDBs por 5 días.

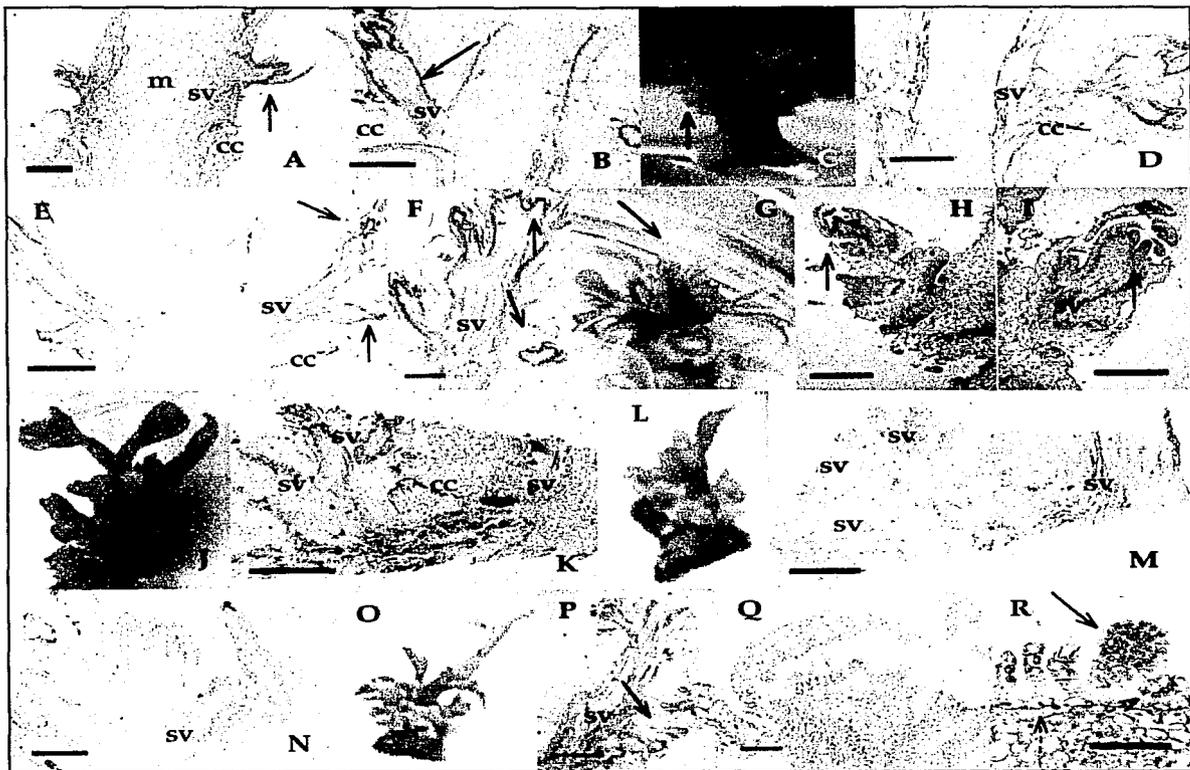


Figura 13. Análisis histológico del proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Peruano. m= médula; sv= sistema vascular; cc= corte del pecíolo del cotiledón. La barra indica 1000µm en B, D, E, K, M, P; 500µm en A, F, H, I; 200µm en N; 100µm en Q y 50µm en R.

- A. Corte longitudinal de explante proveniente de una plántula germinada sin tratamiento, que muestra una yema axilar cotiledonaria (→).
- B. Corte longitudinal de explante de una plántula germinada en medio MG13, que muestra una yema axilar cotiledonaria (→).
- C. Explante cultivado en MIB12 por 2 días, que muestra el desarrollo de las yemas axilares (→)..
- D. Corte longitudinal de un explante cultivado en medio MIB12 por 2 días.
- E. Corte longitudinal del explante a los 3 días de cultivo en MIB12, que muestra la presencia de nuevas yemas (→).
- F. Corte longitudinal una de las yemas axilares cotiledonarias, a los 5 días de cultivo del explante en medio MIB12, se observan yemas (→) y sistemas vasculares maduros y en desarrollo.
- G. Explante cultivado durante 10 días en medio MIB12 con un conjunto de brotes en la zona de la yema axilar cotiledonaria (→).
- H e I. Corte longitudinal de las yemas axilares cotiledonarias (→) de un explante cultivado por 10 días en medio MIB12.
- J. Unidad de brote (UB) cultivada en medio MDB4 durante 5 días.
- K. Corte longitudinal de una UB cultivada en medio MDB4 por 5 días, que presenta sistema vasculares maduros y en desarrollo.
- L. Unidad de brote (UB) cultivada en medio MDB4 durante 5 días.
- M. Corte longitudinal de una UB cultivada en medio MDB4 por 5 días, que presenta sistema vasculares maduros y en desarrollo.
- N. Corte longitudinal de un conjunto de brotes a los 5 días de cultivo en medio MDB4, que presenta brotación múltiple.
- O. Unidad de brote (UB) cultivada en medio MDB4 durante 5 días.
- P. Corte longitudinal de una UB a los 5 días de cultivo en medio MDB4, se observa brotación múltiple (→).
- Q. Zona apical de un brote a los 5 días de cultivo en medio MDB4..
- R. Tricomas (- - →) y de una estructura cuya organización celular es semejante a la de un embrión en etapa globular (→).

Fue en esta etapa en la que se observó en el ápice de uno de los brotes aislados (Fig. 13P y 13Q) una estructura multicelular cuya forma recuerda a un embrión en etapa globular, formado por un cuerpo del embrión rodeado de la protodermis y de un suspensor que es la estructura que lo une al brote (Fig. 13R). De existir una embriogénesis somática, ésta sería una embriogénesis directa, debido a que en ningún momento se dio la formación de un callo; sin embargo, no podemos asegurar que se esté ante la presencia de esta vía de regeneración porque no se encontraron estructuras que pudieran representar al menos dos estadios diferentes del proceso de embriogénesis, y además, debido a que no se estaba buscando esta vía de regeneración no se hicieron los estudios necesarios para el aislamiento, cultivo y desarrollo de embriones, por lo tanto no se tienen plántulas; sólo al cumplir estos dos parámetros se puede asegurar estar en presencia de una embriogénesis somática *sensu stricto* (Ransgaswamy, 1986).

En la búsqueda de otras estructuras embriogénicas se encontró la presencia tricomas tanto en yemas, brotes, como en meristemos (Fig. 14A y 15A). Hasta el momento se han descrito tres tipos de tricomas para *P. vulgaris* L.: un tipo unicelular recto-alargado, un tipo unicelular en forma de garfio y un tipo globular (Navea, *etal.*, 2002). En este trabajo se identificaron tres tipos de tricomas, el primero unicelular alargado ubicado generalmente en la epidermis del explante, de los brotes y de los primordios foliares (Fig. 15C); el segundo tipo fue multicelular uniseriado, encontrado tanto en la epidermis como en la axila del primordio foliar (Fig. 14B, 14C, 15D y 15E), y el tercer tipo multicelular-multiseriado que se presentó principalmente en la axila del primordio foliar (Fig. 15C y 15D). Si bien el tipo de tricoma dos y tres podrían pertenecer a las primeras etapas de desarrollo del tipo globular, para poder definir su patrón de desarrollo haría falta un estudio más detallado. Hasta ahora se ha encontrado que el número, el tamaño y la posición de tricomas en *P. vulgaris* L. es variable. En cuanto a su posible función se ha encontrado que el tipo unicelular de garfio puede ser importante en la resistencia contra insectos (Pillemer y Tingey, 1976) y que el tipo globular puede ser crucial para evitar la pérdida de agua (Navea, *etal.*, 2002).

Cabe mencionar que en la variedad Flor de Mayo se encontró una mayor cantidad de tricomas que en la variedad Peruano; la cantidad de tricomas varía entre cultivares, y se presume que ésta aumenta en genotipos silvestres o que se encuentran bajo estrés hídrico (Pillemer y Tingey, 1976; Navea, *etal.*, 2002).

Todos los meristemos estudiados presentan una organización que podemos incluir dentro del concepto túnica-carpus debido a que la capa celular más externa muestra divisiones celulares anticlinales (túnica) y las capas subyacentes presentan divisiones en diferentes planos (carpus) (Fig. 14C y 15B) (Esau, 1977; Mauseth, 1988; Clark, 1997). Para poder realizar distinciones entre las regiones meristemáticas, y poder establecer la zona

central (CZ) y la zona periférica (PZ) (Clark, 1997) hace falta un estudio detallado sobre la tasa de división celular.



Figura 14. Análisis histológico de yemas y meristemos durante el proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Flor de Mayo. sv- sistema vascular; pf= primordio foliar; t= túnica; c= corpus. La barra indica 2000 μ m en E, 500 m en A, 200 μ m en B y 100 m en C y D.

A y B. Cortes longitudinales de yemas axilares (T0), tricomas unicelulares lineales y multicelulares lineales (- - a)..
 C. Corte longitudinal de un meristemo presente en la yema axilar cotiledonaria de un explante cultivado por 3 días en MIB10, muestra una organización túnica-corpus, y la presencia de tricomas multicelulares lineales
 D. Corte longitudinal de un meristemo a los 15 días del cultivo del explante en MIB10, que presenta tricomas multicelulares lineales (- - a).
 E. Corte longitudinal de un meristemo a los 15 días de cultivo en medio MIB10, con tricomas multicelulares lineales (- - a).

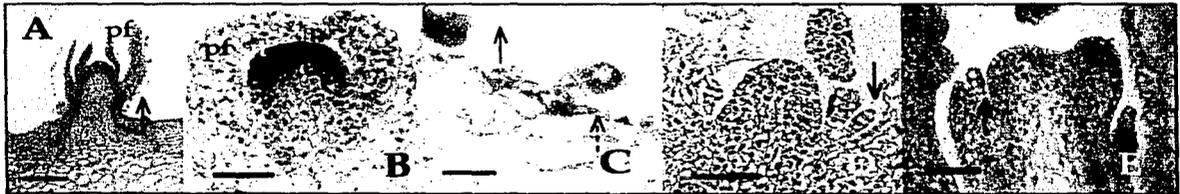


Figura 15. Análisis histológico de yemas y meristemos durante del proceso de regeneración de *P. vulgaris* L. variedad Peruano. pf= primordio foliar; t= túnica; c= corpus. La barra indica 200 μ m en A; 50 μ m en C, D y E, y 20 μ m en B.

A. Corte longitudinal de una yema axilar cotiledonaria al T0 proveniente de una plántula germinada sin tratamiento, presenta tricomas en los primordios foliares (a)..
 B. Corte longitudinal de una yema a los 3 días de cultivo del explante en medio MIB12.
 C. Corte longitudinal de un tricoma unicelular en forma de garfio (a) y de un tricoma multicelular multicariado (- - a)
 D y E. Cortes longitudinales de meristemos los 5 días de cultivo de la UB en medio MIB12, presentan tricomas multicelular unicariado (a) y tricomas multicelular multicariado (- - a)..

Mclean y Grafton (1989) encontraron que al eliminar las yemas axilares cotiledonarias se formaban brotes en la zona del nodo y en otras partes del explante; por otro lado Frankling, *et al.*, (1991) proponen que tanto la yema axilar cotiledonaria como el cotiledón, o una parte de este, deben estar presentes para que se de un "anillo meristemático" y puedan formarse brotes adventicios. Malik y Saxena (1992b) proponen

que la integridad de la planta aumenta la producción de yemas y brotes; y aunque reportan que la formación de estos es *de novo* mencionan que es posible que provengan de meristemos preformados. En el análisis histológico de este trabajo no se encontró que se presentara reacción de tejidos por "arriba" de la zona de la yema axilar o en la zona del corte del peciolo del cotiledón, la cual presentó una obstrucción de los haces vasculares y la formación de lo que podría ser una peridermis, es decir que cicatrizó, lo que indica que la formación de las yemas, tanto axilares como adventicias, fue a partir de los meristemos preformados pertenecientes a las yemas axilares cotiledonarias.

Después de realizar el análisis histológico del proceso de regeneración llevado a cabo para las variedades de *P. vulgaris* L. Flor de Mayo y Peruano, surgieron varios puntos importantes a discutir. El primero se refiere al cultivo de explantes en presencia de BAP. Los tiempos de cultivo en medio MIB se establecieron sólo sobre la apariencia de los explantes y de los brotes que se obtenían, el análisis histológico muestra que la generación y el desarrollo de brotes y de nuevas yemas es un proceso continuo, como ya se ha mencionado, y que se da aun cuando se ha eliminado el BAP; lo que nos puede estar indicando que en los tejidos involucrados en la generación de nuevos meristemos, las yemas y brotes ya se encuentran determinados a seguir una vía morfogénica, es decir que el estímulo inductor ya fue dado por lo que no se necesita de la presencia de BAP para que tal vía siga su proceso. Se debe tomar en cuenta que no sólo los niveles del RCV exógeno afectan el proceso de formación de yemas y brotes, ya que también se encuentran involucrados sus niveles endógenos en las células y su interacción con otros factores, como nucleótidos, ácidos fenólicos y moléculas anti-auxina, que se encuentren involucrados en el proceso de morfogénesis; y además de que se considera que las fitohormonas parecen funcionar como "switchs" de patrones de desarrollo (Warren, 1991; Joy IV y Thorpe, 1999). De esta manera se puede dar un replanteamiento del protocolo de regeneración, cambiando los tiempos de exposición y de la concentración de BAP, con el propósito de disminuir o evitar los problemas asociados con el uso de citocininas tales como hiperhidratación del brote, inhibición de su crecimiento y desarrollo, expansión de hojas, entre otros, y sobretodo aumentar el número de brotes y la eficiencia de regeneración.

Otro punto, se refiere al tiempo óptimo de separación de los brotes. Durante los experimentos se observó que había un número considerable de brotes en una UB, sin embargo su separación resultaba difícil; antes de realizar el análisis histológico se había propuesto que la no sobrevivencia de los brotes se debía a que no presentaran un sistema vascular lo suficientemente desarrollado como para permitirles continuar con su desarrollo; sin embargo las observaciones sugieren que se necesita mejorar el método de separación de brotes y de yemas, y de ser necesario recurrir a otras técnicas de cultivo, como por ejemplo de cultivo de meristemos.

Por último, dentro del contexto del cultivo de tejidos vegetales como una herramienta y un requisito para la implementación de técnicas de transferencia de genes, se ha

encontrado que el análisis histológico puede ayudar a establecer el origen de las estructuras, los tejidos y/o tipos celulares que se usarán como blanco en la transformación genética (Birch, 1997), aunado al hecho que estos estudios permiten obtener una noción más clara sobre el proceso de regeneración. De esta manera se pueden formular nuevas estrategias de regeneración y/o de transformación, optimizar las ya establecidas y descartar aquéllas que resulten poco eficientes.

V CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos, se pudo establecer un proceso de regeneración para cada una de las variedades de frijol estudiadas; lo que permite plantear una estrategia general para la regeneración de *Phaseolus vulgaris* L.

Los resultados obtenidos mostraron que el usar medio sólido en cajas Petri influye de manera positiva en el cultivo de los explantes (MIB8, MIB10, MIB12 y MIB 15). También, que el uso de medios líquidos es un punto clave para el desarrollo de los brotes y su consecuente enraizamiento (MDB5 y MDB13). De igual manera, se encontró que el uso de cajas Magenta con tapa miliporo ayuda significativamente en la aclimatación de las plantas regeneradas, aumentando la eficiencia de regeneración.

La eficiencia de regeneración obtenida fue diferente para cada una de las variedades, lo que muestra una variación genotípica intraespecífica en la respuesta al proceso establecido en este trabajo.

La vía de regeneración es organogénesis directa, por brotación múltiple tanto axilar como adventicia.

La falta de un sistema de regeneración en frijol, ha sido el principal impedimento para su transformación genética; así el presente trabajo contribuye a la eliminación de éste problema al proponer una estrategia de regeneración para cuatro de las variedades mexicanas más importantes, que sirva de punto de partida para la aplicación de un proceso de transformación genética, lo cual representa un avance más en el estudio de esta especie.

VI PERSPECTIVAS

VI.1 Eficientizar el proceso de regeneración.

- Siguiendo el estudio en las variedades que mostraron una eficiencia de regeneración menor al 80 %, con el propósito de obtener una mayor eficiencia de regeneración (Obtención de plantas adultas respecto al número de explantes cultivados).
- Utilización de otros reguladores de crecimiento vegetal, que promuevan la formación y el desarrollo de brotes.
- Inducción de otras vías de regeneración, como organogénesis indirecta y embriogénesis somática en las variedades estudiadas en el presente trabajo (Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano).

VI.2 Aplicación del protocolo en otras variedades de frijol.

Con base en el protocolo desarrollado, trabajar con otras variedades abarcando tanto a las denominadas de élite como a variedades silvestres, con el objetivo de obtener una estrategia amplia de regeneración para *Phaseolus vulgaris* L.

VI.3 Generación de plantas transgénicas de frijol.

Una vez que el problema de obtener plantas regeneradas haya sido solventado de manera eficiente, integrar el protocolo de regeneración obtenido en este trabajo a la transformación mediada por *Agrobacterium*, en las variedades Americano, Flor de Junio, Flor de Mayo y Peruano.

VII REFERENCIAS

- Allavena, A. 1984. **Beans (*Phaseolus*)**. En: Sharp, W.R., Evans, D.A., Ammirato, P.V. y Y. Yamada. Handbook of plant cell culture. Vol. 2, *Crop Species*. MacMillan Publishing Co. New York, USA. pp. 137-165.
- Angelini, R. R. y A. Allavena. 1989. Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*P. coccineus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19: 167-174.
- Bhojowani, S. S. y M. N. Razda. 1989. Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier. Amsterdam, Holanda.
- Birch, R. G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 297-326.
- Bryant, J. A. y D. Chiante. 1997. Plant cell proliferation and its regulation in growth and development. John Wiley & Son. Londres, Inglaterra.
- Burgess, J. 1985. An introduction of plant cell development. Cambridge University Press. New York, USA.
- Christou, P. 1997. Biotechnology applied to grain legumes. *Field Crop Research*, 53:83-97.
- Clark, S. E. 1997. Organ formation at the vegetative shoot meristem, *The Plant Cell*, 9:1067-1076.
- Clouse, S. D. 1998. Brassinoesteoids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 427-451.
- Creelman, R. A. y J. E. Mullet. 1997 a. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *The Plant Cell*, 9: 1211-1223.
- . 1997 b. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48 355-381.
- Crocomo, O. J., W. R. Sharp y J. E. Peter. 1976. Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of *Phaseolus vulgaris* with the addition of bean seed extract. *Z.Pflanzenphysiol. Bd.78.S.456-460*.

- Cruz de Carvalho, M., Van Le B., Zuily-Fodil Y., Pham Thi A. T. y K. T. T. Van. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris*) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science*, 159:223-232.
- Davies, P. 1990. Plant Hormones, and their role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos.
- Demeester, J. J., Matthijs, D. G., Pascat, B. Y P. C. Debergh. 1995. Toward a controlable headspace composition-growth, development, and headspace of micropropagated *Prunus* rootstock in different containers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 31: 105-112.
- Diego, E. 1998. Regeneración y transformación genética de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.
- Dillen, W., De Clercq, J., Van Montagu, M. y G. Angenon. 1996. Plant regeneration from callus in a range of *Phaseolus acutifolius* A. Gray genotypes. *Plant Science*, 118:81-88.
- Doddo, J.H. y L.W. Roberts. 1982 . Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. USA.
- Engleman, E. M. 1979. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Esau, K. 1977. Anatomy of Seed Plants. 2 ed. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA.
- Evans, N. E. 1990. **Micropropagación**. En: Pollard, J.W. y J.M. Walker. Plant cell and tissue culture. Methods in molecular biology, Vol. 3 . Humana Press. New York, USA.
- Finer, J. J. 1995. **Direct somatic embriogénesis**. En: Gamborg, O.L. y G.C. Phillips. Plant, cell, tissue and organ culture. Fundamental Methods. Springer. Alemania.
- Flores, F. 1993. Regeneración de *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Jamapa a partir de diversos explantes. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Franklin, C. I., Trieu, T. N., Gonzalez , R. A. y R. A Dixon. 1991. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 24: 199-206.
- Garman, J.G. 1990. Embriogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cellular and Developmental. Biology*, 26: 746-753.

- Genga, A. y A. Allavena. 1991. Factors affecting morphogenesis from immature cotyledon of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 189-196.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Edington, Wits. USA.
- Granell, A. y J. Carbonell. 1995. Las hormonas vegetales. *Investigación y Ciencia*, Abril:40-448.
- Hall, R. D. 1999. Plant cell culture protocols. *Methods in molecular biology*. Vol. 111. Totovna. New York, USA.
- Hammerton, R., B. Nicander y E. Tillberg. 1998. Irradiance-induced alteration of growth and cytokinins in *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 25: 63-69.
- Hedden, P. y Y. Kamiya. 1997. Gibberellin Biosintesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 431-460.
- Hernández X, E., A. Ramos-Rodríguez y M. A. Martínez-Alfaro. 1979. **Etnobotánica**. En: Engleman, E. M. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Heywood, V. H. 1993. Flowering plants of the world. BT Batsford Ltd. Londres, Inglaterra.
- Joy IV, W. R. y T. A. Thorpe. 1999. **Shoot morphogenesis**: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. En: Soh, W-Y. y S. S. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Press.
- Kapila, J., De Rycke R., Van Montagu M. y G. Angenon. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122: 101-108.
- Kaplan, L. 1965. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (Beans). *Economic Botany*, Vol.19: 358-368.
- y T. F. Lynch. 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian agriculture. *Economic Botany*, 53 (3):261-272.

- Kartha, K. K., Phal, K., Leug N. L. y L. A. Mroginski. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes; soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Canadian Journal of Botany*, 59:1671-1679.
- Kende, H. y J. A. D. Zeevaart. 1997. The five "classical" plant hormones. *The Plant Cell*, 9:1197-1210.
- Khalafalla, M. M. y K. Hattori. 1999. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Growth Regulation*, 27: 145-148.
- Kim, J. W. y T. Minamikawa. 1996. Transformation and regeneration of french bean plants by the particle bombardment process. *Plant Science*, 117:131-138.
- Lakshmanan, P. y A. Taji. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*, 2: 136-148.
- Leon, P., Planckaert, F. y V. Walbot. 1991. Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from cell suspension culture. *Plant Physiology*, 95: 968-972.
- Leung, J. y J. Giraudat. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:199-222.
- López-Curto, M. L., Márquez-Juzmán, J.G. y Murguía-Sánchez, G. 1998. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Facultad de Ciencias UNAM.
- Lutova, L. A., Bondarenko, L. V., Buzovkina, I. S., Levashina, E. A., Tikhodeev, O. N. Khodzhaiova, L. T. , Sharova N. V. y S. O. Shishkova. 1994. The influence of plant genotype on regeneration processes. *Russian Journal of Genetic*, 30 (8): 928-936.
- Malik, K.A. y P. K. Saxena. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 184: 148-150.
- 1992 a. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. : high-frequency induction of direct shoot formation in intact seedling by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, 186:384-389.
- 1992 b. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedling of *Phaseolus acutifolius* A., *Phaseolus aureus* (L.) Wilczek, *Phaseolus coccineus* L., and *Phaseolus wrightii* L. *Plant Cell Reports*, 11: 163-168.
- Mauseth, J.D. 1988. Plant Anatomy. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. USA.

- Martins, I.S. y M. R. Shondahl. 1984. Early stages of embryo differentiation from callus cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in liquid medium. *J. Plant Physiology*, 117: 97-103.
- McClellan, P. y K. F. Grafton. 1989. Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant science*, 60: 117-122.
- McIntyre, G. I. 2001. Control of plant development by limiting factors: a nutritional perspective. *Physiologia Plantarum*, 113: 165-175.
- Mohamed, M. F., P. E. Read y D. P. Coyne. 1992a. Plant regeneration from in vitro culture of embryonic axis explants in common and tepary beans. *Journal of American Societe of Horticultural Science*, 117 (2): 3332-336.
- 1992b. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explant of common and faba bean. *Journal of American Societe of Horticultural Science*, 117 (4): 668-672.
- Mohamed, M. F., Coyne, D. P. y P. E. Read. Shoot organogénesis in callus induced from pedicel explants of common (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of American Societe of Horticultural Science*, 118(1):158-162.
- MoK, D.W.S. y M. C. Mok. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:89-118.
- Monnier, M. 1990. **Induction of embryogenesis in callus culture.** En: Pollard, J.W. y J.M. Walker. Plant cell and tissue culture. Methods in molecular biology, Vol. 3. Humana Press. New York, USA.
- Mroginski, L. A. y K. K. Kartha. 1985. Tissue culture of legumes for crop improvement. *Plant Breeding Reviews*, 2: 215-264.
- Nagl, W., Ignacimuthu, S. y J. Becker. 1997. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. *Journal of Plant Physiology*. 150: 625-644.
- Navea, C., Terrazas, T. Delgado-Salinas, A. y P. Ramírez Vallejo. 2002. Foliar response of wild and domesticated *Phaseolus vilgaris* L. to water stress. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 00: 1-8.
- O'Neill, S.D. 1997. Pollination regulation of flower development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:547-574.

- Pillemer, E. A. y Tingey W. M. 1976. Hooked trichomes: a physical plant barrier to a major agricultural pest. *Science*, 193: 482-484.
- Phillips, G. C. y J.F. Hubstenberger. 1995. **Micropropagation by proliferation of axillary buds**. En: Gamborg, O.L. y G.C. Phillips. Plant, cell, tissue and organ culture. Fundamental Methods. Springer. Alemania.
- Phillips, G.C., Hubstenberger, J.F. y E. E. Hansen. 1995. **Adventitious shoot proliferation**. En: Gamborg, O.L. y G.C. Phillips. Plant, cell, tissue and organ culture. Fundamental Methods. Springer. Alemania.
- Rangaswamy, N.S. 1986. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. *Indian Acad. Sci. (Plant Science)*, 96(4):247-271.
- Russell, D. R., Wallace, K. M., Bathe, J. H., Martinell, B. J. y D. E. McCabe. 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* L. via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 12: 165-169.
- Saker, N.M y T. Kühne. 1997/8. Production of transgenic kidney bean shoots by electroporation of intact cells. *Biologia Plantarum*, 40 (4): 507-514.
- Santalla, M., Power, J. B. y M. R. Davey. 1998. Efficient *in vitro* regeneration responses of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*. *Euphytica*, 102:195-202.
- Smeekens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51:49-81.
- Stepan-sarkissian, G. 1990. **Selection of media for cell culture**. En: Pollard, J.W. y J.M. Walker. Plant cell and tissue culture. Methods in molecular biology, Vol. 3. Humana Press. New York, USA.
- von Arnim, A. y X.-W. Deng. 1996. Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 215-243.
- Warren, G. 1991. **The regeneration of plants from cultures cells and tissues**. En: Stafford. A. y E. Warren. Plant cell and tissue culture. Open University Press. USA.
- Xiu-Quig Li y Y. Dermanly. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago suffruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 79-81.
- Yeoman, M. M. 1986. Plant cell culture technology. Blackwell Scientific. Oxford, USA.

Zambre, M.A. , De Clercq, J., Vranová, E., Van Montagu, M., Argenon, G. y W. Dillen.
1998. Plant regeneration from embryo-derived callus in *P. vulgaris* L. (common
bean) and *Phaseolus acutifolius* A. Gray (tepary bean). *Plant Cell Report*, 17: 626-630.

-----, Geerts, P., Maquet, A., Van Montagu, M., Dillen, W. y G. Angenon. 2001.
Regeneration of fertile Plants from callus in *Phaseolus polyanthus* Greenman (Year
bean). *Annals of Botany*, 88: 371-377.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

<http://www.ciat.cgiar.org/>

Cali, Colombia. Junio del 2001

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Programa Nacional de Frijol.

Dr. Jorge A. Acosta Gallegos (Líder nacional del Programa de Frijol)

<http://www.inifap.conacyt.mx/>

Junio 2001.

Programa Cooperativo Regional de Investigación en Frijol (PROFRIJOL) para
Centroamérica, México y el Caribe.

<http://www.guate.net/profrijol/index.htm>

Junio 2001.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
(SAGARPA)

<http://www.sica.sagarpa.gob.mx/>

Marzo 2002.

Fitorreguladores.

Auxinas

Las auxinas fueron los primeros reguladores de crecimiento vegetal que se aislaron (años 30's del siglo XX). El ácido indolacético (IAA) es la principal auxina en plantas; otras auxinas son el ácido indolbutírico (IBA), el ácido α -naftalénico (ANA) y el ácido 2,4- dicloro_ fenoxiacético (2,4-D). El IAA se sintetiza principalmente en primordios de hojas, en hojas jóvenes y en semillas en desarrollo y se transporta de célula a célula; quizá en las raíces se encuentra involucrado el transporte por floema. El IAA se forma a partir de triptofano, vía ácido indolpirúvico, triptamina o indol-3-acetamina, y por una vía triptofano-independiente. Los niveles de IAA en un tejido dependen de un gran número de factores, principalmente de su tasa de síntesis y degradación vía una de descarboxilación oxidativa mediante enzimas oxidativas, que se da preferente mente en las paredes celulares. Otra manera de regulación parece ser la formación de conjugados con aminoácidos, péptidos o carbohidratos; éstos son biológicamente inactivos, funcionan como formas de almacenamiento de auxinas e influyen sobre la homeostasis "hormonal". Las auxinas son responsables del alargamiento celular, de la división celular (en el cámbium, y junto con citocininas en CTV), de la diferenciación de tejido vascular, de la iniciación y crecimiento de raíz, de los tropismos, de la dominancia apical, de la senescencia foliar, de la abscisión de hojas y frutos, de la maduración de frutos y de la floración (Burgess, 1985; Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Kende y Zeevart, 1997).

Citocininas

Las citocininas fueron la segunda clase de fitorreguladores en descubrirse (a mediados del siglo XX). Son derivados de N⁶-adenina y se caracterizan por su habilidad para inducir división celular en tejidos en cultivo (en la presencia de auxinas), siendo la más común la zeatina. Además de las plantas superiores varias especies de procariontes, como *Agrobacterium*, producen citocininas. En plantas el precursor de estos fitorreguladores es el 5'- monofosfato isopentiladenosina. Es generalmente aceptado que las bases libres, tales como isopentil adenina, zeatina y dihidrozeatina son las formas activas, y que son inactivadas irreversiblemente por dos vías: una es la formación de conjugados con glucosa y la otra implica la oxidación del extremo N⁶ por la citosina oxidasa, ésta enzima parece inducirse por los niveles de su sustrato.

Las citocininas se sintetizan en el ápice de la raíz y en semillas en desarrollo, y su transporte se da vía el xilema desde las raíces hacia los brotes. El metabolismo de las citocininas es complejo considerando además las interconversiones existentes entre éstas y otras moléculas (bases, nucleótidos y nucleósidos). Se ha caracterizado una gran cantidad de proteínas que unen a ellas, sin llegar aún a la conclusión de que

sean receptores verdaderos y cuál es su verdadera función, pero se consideran los iniciadores de la cascada de señalización de citocininas. La acción de las citocininas a nivel molecular y de toda la planta aún se desconoce. Se tiene evidencia de que las citocininas estimulan la división celular y la formación de tejidos meristemáticos, pero la relación directa de estos eventos y las citocininas aún no se tiene. Sin embargo se considera que las citocininas son responsables de la división celular; la morfogénesis (al inducir yemas y brotes), del crecimiento de yemas axilares, de la expansión de hojas, que evitan la senescencia foliar, que pueden promover la abertura de estomas y desarrollo de cloroplastos (Burgess, 1985; Davies, 1990; Granell y Carbonell, 1995; Kende y Zeevart, 1997; Mok y Mok, 2001).

Giberelinas (GAs)

Hasta ahora se han identificado alrededor de 112 tipos de GAs. Los sistemas que presentan grandes cantidades de GAs son el hongo *Gibberella fujikuroi*, semillas inmaduras de calabaza, de chícharos y de frijol. Las GAs se sintetizan en tejidos jóvenes del tallo, principalmente en internodos, brotes y hojas; en semillas en desarrollo y en raíz, en vainas jóvenes de leguminosas y en el pericarpo de frutos en desarrollo. La mayoría de los retardadores de crecimiento vegetal (como el ancimidol y el paclobutrazol) actúan sobre la síntesis de GAs. Su biosíntesis comienza en plastidos, donde partiendo de geranylgeranyl difosfato se forma ent-kaurena, y partiendo de éste, en el retículo endoplasmático, se forma aldehído GA₁₂ del cual se obtienen, en el citoplasma, varios GAs. Probablemente su transporte es por floema y xilema. Estos fitoreguladores actúan durante todo el ciclo de vida de una planta, influyen en la germinación de semilla (la inducen), estimulan la división y elongación celular en el tallo, y la elongación de éste en respuesta a la duración del día, estimulan la floración y el desarrollo de anteras, inducen desarrollo de semillas, de pericarpo y del fruto en general. Además tienen un papel importante como mediadores de estímulos ambientales, ya que factores como fotoperíodo y temperatura pueden modificar su metabolismo. Su biosíntesis también puede ser regulada por GAs. El metabolismo de GAs es sensible a la intensidad luminosa, cuando ésta es baja las concentraciones de GAs aumentan. La inducción de la germinación y la floración (vernalización) a bajas temperaturas también está mediado por GAs (Davies, 1990; Granell y Carbonell, 1995; Kende y Zeevart, 1997; Hedden y Kamiya, 1997).

Acido Abscísico (ABA)

Este compuesto se aisló en los 60's del siglo XX. Se ha encontrado que el ABA es sintetizado a partir del ácido mevalónico en hojas maduras, especialmente como respuesta a estrés hídrico, incrementando su síntesis cuando las células pierden turgencia, y cuando hay crecimiento vegetativo; las semillas generalmente también son ricas en ABA. Aun no se conocen receptores de ABA, pero se sabe que es exportado desde las hojas por el floema, que podría transportarse a las raíces por éste y después regresar a los brotes mediante el xilema. En la expresión de ABA se han identificado varios elementos que actúan de manera *cis*, entre ellos están los ABRES (*ABA Response Elements*) que implican genes de proteínas LEA y reguladores de la

síntesis de antocianinas; y los que actúan de manera *trans*, proteínas con un motivo "zipper" de leucina. La expresión está regulada por la fosforilación reversible de proteínas, ya que ABA estimula actividad de MAP cinasas; y hay evidencia que los niveles de calcio libres en el citosol y el pH citoplasmático pueden actuar como segundos mensajeros en la regulación de genes por ABA (señalización cascada abajo). El ABA promueve el cierre de estomas por la alteración del flujo de iones (K⁺ y Cl⁻) de la vacuola al citoplasma en las células guarda, al parecer causando la activación de canales iónicos por la despolarización que ABA produce sobre la membrana. Además de limitar la transpiración por el cierre de estomas, el ABA está implicado en la inducción y regulación de genes involucrados en la respuesta contra sequía, salinidad y frío, y daño mecánico. Se considera que el ABA juega un papel principal en la maduración y germinación de semillas; se le considera responsable de la movilización de fotosintatos hacia las semillas en desarrollo y la salida de éstos a embriones en desarrollo, de la inducción de almacenamiento de proteínas en semillas, de la regulación de varios procesos durante el desarrollo de los primeros estado de la formación del embrión y que de esta manera interviene en la inducción de dormancia, la acumulación de material de reserva y la adquisición de tolerancia a desecación (Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Kende y Zeevart, 1997; Leung y Giraudat, 1998).

Etileno

El etileno tiene como característica principal el ser un gas y como tal se mueve, por difusión entre los espacios intercelulares, desde sus sitios de síntesis, que son la mayoría de los tejidos vegetales en particular en aquéllos que se encuentran en senescencia, en maduración o expuesto a algún tipo de estrés. El precursor de etileno es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). La síntesis de etileno es fuertemente promovida por la hipoxia, y bloqueada por la anoxia, debido al requerimiento de O₂ libre para la conversión de ACC a etileno. Su acción implica retirar de dormancia e inducir la diferenciación de brotes y raíces, la formación de raíces adventicias, la abscisión de hojas, frutos y flores, la inducción de floración en algunas especies y maduración de frutos. Se ha asociado la producción de etileno endógeno con la senescencia del perianto y se considera que juega un papel importante en la coordinación de la senescencia del perianto regulada por polinización. También se ha encontrado que etileno promueve la acumulación de antocianina, el cambio de "color" de la flor que mantiene su "atractivo" por un rango mayor de tiempo parecen influir en la señal a polinizadores. El etileno es un factor importante en el desarrollo del ovario. Se considera que el etileno es necesario para la coordinación y finalización de la maduración de frutos climatéricos (jitomate, aguacata, manzanas y plátanos, por ejemplo), en contraste con las no-climatéricas (limón, uva, fresa) (Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Kende y Zeevart, 1997; O'Neill, 1997).

Oligosacarinas

Las oligosacarinas son carbohidratos complejos capaces de modular el crecimiento y desarrollo vegetal a bajas concentraciones. Las oligosacarinas exógenas pueden

modular respuestas de defensa el crecimiento de segmentos de tallo, morfogénesis en CTV y la inducción de primordios de raíz. Dentro de este grupo están las pectinas, que son los principales polisacáridos de la pared primaria, estos compuestos pueden contener galactosa, arabinosa y ramnosa. Se ha propuesto que, a bajas concentraciones, pueden ser antagonistas de las auxinas; que pueden promover la formación de flores y de raíces; algunas, como los oligogalacturónidos, actúan como activadores y estimulan respuestas de defensa contra patógenos. Otro grupo son los xiloglucanos, componentes de la hemicelulosa, los cuales forman fuertes uniones no covalentes con las microfibrillas de celulosa en las paredes celulares. Esta unión entre celulosa y xiloglucanos ha sido propuesta como el factor más importante en el control de la elongación celular y el crecimiento vegetal (Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Creelman y Mullet, 1997).

Brassinosteroides (BRs)

Los BRs son esteroides polihidroxilados, y se han identificado una gran cantidad de ellos, alrededor de 60, de los cuales 31 se encuentran bien caracterizados. Se ha identificado en dicotiledóneas, monocotiledóneas, gimnospermas, algas verdes y helechos; y se han aislado de tejidos jóvenes, de semillas, de frutas, brotes, hojas, flores, yemas y heridas. Sus niveles varían de tejido a tejido, siendo los más ricos el polen y las semillas inmaduras, de hecho los primeros fueron aislados de polen del nabo *Brassica napus*. Debido a que las BRs causan la elongación y división celular en segmentos de tallos maduros y en plántulas; se ha encontrado que inhiben el crecimiento de raíces e incrementan el gravitropismo y la resistencia a estrés, que retardan la abscisión foliar y promueven el desarrollo de tejidos vasculares (diferenciación de xilema) y que por lo tanto pueden modular fuertemente el crecimiento vegetal (Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Creelman y Mullet, 1997; Clouse, 1998).

Jasmonatos (JA)

Los jasmonatos, el ácido jasmónico (JA) y el metil jasmonato (MeJa) son compuestos derivados del ácido linolénico. Los niveles de JA varían de acuerdo al tipo de tejido y tipo celular, el estado de desarrollo y el estímulo ambiental. Sus niveles son incrementados por perturbaciones mecánicas, reducción en el turgor (por déficit de agua) y por heridas. Las funciones atribuidas a los jasmonatos incluyen: la inhibición de germinación de semillas no dormantes y estimula la germinación de las dormantes; ha mostrado inhibir fuertemente el crecimiento de la raíz por un mecanismo que no es mediado por Etileno. El JA y sus derivados influyen sobre la formación de flores, frutos y semillas pueden modular varios aspectos de la maduración de frutos y composición de carotenoides en éstos, pueden intervenir en la producción de polen viable, el crecimiento de raíces y el enrollamiento de zarcillos; también podrían tener un papel en la atracción de insectos y por lo tanto de dispersión de polen. Los JA activan genes involucrados en la resistencia a insectos y patógenos, y genes que codifican para proteínas de almacenamiento, y reprimen genes de proteínas involucradas en la fotosíntesis. Así JA modula genes a nivel de

transcripción, traducción y de procesamiento de RNA (Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Creelman y Mullet, 1997 a y b).

Poliaminas

Son compuestos que presentan un amplio rango de efectos, y parecen ser esenciales para el crecimiento vegetal, particularmente para la división celular. El tipo de control sobre el desarrollo vegetal que ejercen estos compuestos se encuentra mucho más relacionado con el de las fitorreguladores que con el que ejercen los aminoácidos o las vitaminas. Estos compuestos se presentan en todas las células, y cuando sus niveles son alterados, el desarrollo vegetal también lo es (Davies, 1990).

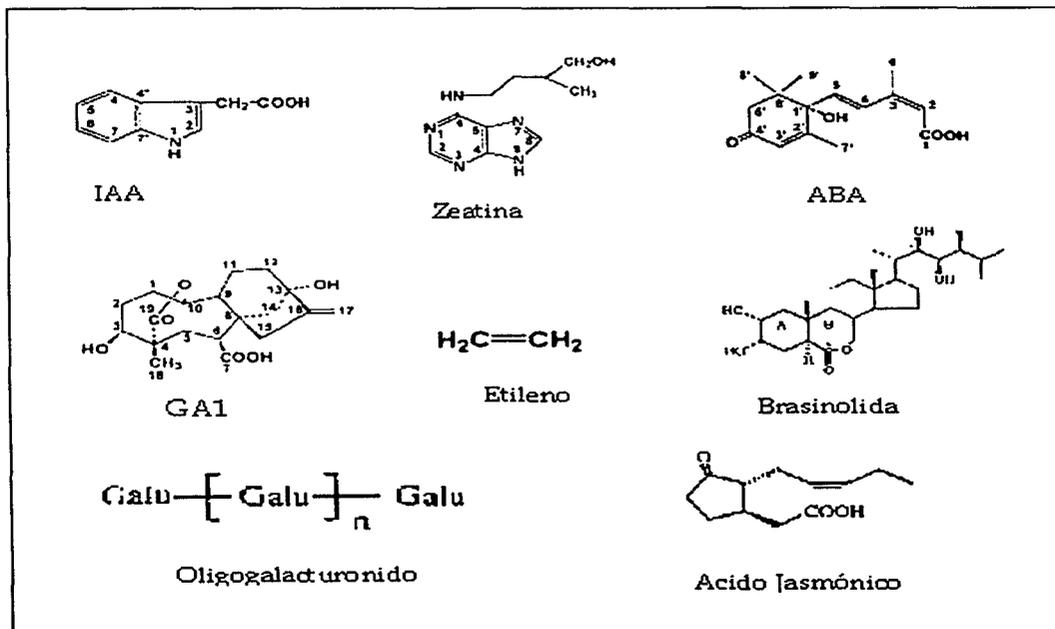


Figura 16. Compuestos ejemplos de los diferentes grupos de fitorreguladores (Davies,1990; Granell y Carbonell, 1995; Creelman y Mullet, 1997).

ANEXO 2

**Componentes del medio MS/B5:
medio Murashige & Skoog (MS)
y vitaminas de medio Gamborg (B5)**

Compuesto	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	33.6
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Acido Nicotínico	1
Piridoxina HCl	1
Tiamina HCl	10
Myo-Inositol	100

ANEXO 3

Componentes de la solución nutritiva de Hoagland.

Solución Patrón	Patrón de dilución	Fórmula	PM (g/mol)	Peso (g/l)	Concen_ tración (M)
Solución A	100X	CaCl ₂	111	11.0994	0.1
Solución B	100X	K ₂ HPO ₄	136	6.8045	0.5
Solución C	100X	Na ₂ EDTA FeSO ₄ • 7 H ₂ O		1.855	
Solución D	100X	MgSO ₄ • 7 H ₂ O K ₂ SO ₄	246.5 174	6.1624 4.35	0.025 0.025
Solución E	1000X	MnSO ₄ • 4 H ₂ O H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ • 7 H ₂ O CuSO ₄ • 5 H ₂ O CoCl ₂ • 6 H ₂ O Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	169 67 287.5 249.7 238 242	0.1690 0.1236 0.1430 0.0499 0.0237 0.0240	0.001 0.002 0.0005 0.0002 0.0001 0.0001

Nota. Las soluciones se usaron en las siguientes cantidades: se toman 10ml/l de las soluciones A,B,C y D, y 1ml/l de la solución E, aforando con agua destilada.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**