



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación del crecimiento de cultivos celulares de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.) de dos variedades expuestas a
condiciones de estrés hídrico**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

JESSICA OSORIO GARCÍA



CD. MX.

AÑO 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: I.A TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

SECRETARIO: OSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ

1er SUPLENTE: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

2° SUPLENTE: ALBERTO GARCÍA LOZANO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 116, dpto. Bioquímica, Facultad de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Teresa de Jesús Olivera Flores

SUPERVISOR TÉCNICO:

Aracely Arandal Martínez

SUSTENTANTE:

Jessica Osorio García

INDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abreviaturas | i |
| Índice de tablas | iii |
| Índice de imágenes | iv |
| Índice de figuras..... | v |
| Índice de gráficos | vi |
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| II. ANTECEDENTES | 5 |
| 2.1 El frijo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..... | 5 |
| 2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica del (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) | 5 |
| 2.1.2 Orígen y distribución del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..... | 11 |
| 2.1.3 Importancia económica y nutrimental..... | 13 |
| 2.1.4 Variedades de frijol | 16 |
| 2.2 El Cultivo de tejidos..... | 18 |
| 2.2.1 Factores que modulan la morfogénesis | 19 |
| 2.2.2 Cultivos de callos y células en suspensión | 24 |
| 2.2.3 Cultivos de callos y células en suspensión del Frijol..... | 30 |
| 2.2.4. Cultivos celulares <i>in vitro</i> bajo condiciones de estrés hídrico. | 32 |
| III. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 Objetivo general..... | 34 |
| 3.2 Objetivos particulares..... | 34 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 34 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 35 |
| 5.1 Material biológico | 36 |
| 5.2 Preparación de medios de cultivo | 36 |
| 5.3 Condiciones de incubación | 37 |
| 5.4 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos..... | 37 |
| 5.5 Inducción y proliferación de callos | 39 |
| Tabla 7. Composición de medio para inducción y proliferación de callos FC-C y FC-1..... | 39 |
| 5.6 Cultivos de células en suspensión | 40 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.7 Ensayo de estrés hídrico..... | 41 |
| 5.8 Caracterización de las líneas celulares..... | 43 |
| 5.8.1 Peso fresco y peso seco..... | 43 |
| 5.8.2 Conteo y viabilidad celular (Ensayos 1 y 2)..... | 44 |
| VI. RESULTADOS..... | 45 |
| 6.1 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos..... | 45 |
| 6.2 Inducción y proliferación de callos..... | 46 |
| 6.3 Cultivo de células en suspensión..... | 48 |
| 6.4 Caracterización de las líneas celulares..... | 49 |
| 6.4.1Peso fresco y peso seco..... | 49 |
| 6.4.2 Conteo y viabilidad celular..... | 58 |
| VII. Discusión y análisis de resultados..... | 64 |
| 7.2 Inducción y proliferación de callos..... | 67 |
| 7.3 Caracterización de las líneas celulares..... | 70 |
| 7.3.1Peso fresco y peso seco..... | 70 |
| 7.3.2 Conteo y viabilidad celular..... | 79 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 86 |
| IX. PERSPECTIVAS..... | 87 |
| X. BIBLIOGRAFÍA..... | 88 |
| XI. ANEXOS..... | 91 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------|---------------------------------|
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| mm. | Milímetros |
| °C | Grados Celsius |
| cm | Centímetros |
| dds | Días después de la siembra |
| 2-4 D | Ácido 2-4 Diclorofenoxiacético |
| AIA | Ácido indol-3-acético |
| ANA | Ácido α -Naftalenacetico |
| AIB | Ácido indol-3-butírico |
| BA | Benciladenina |
| AG ₃ | Ácido giberélico |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| TDZ | Tidiazurón |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| h | Horas |
| mM | Milimolar |
| PEG | Polietilenglicol |
| μ l | Microlitros |
| C | Control |
| T1 | Tratamiento 1 |
| T2 | Tratamiento 2 |
| PF | Peso fresco |
| PS | Peso seco |
| CB | Control Bayo |
| CP | Control Pinto |

| | |
|------|----------------------------------------------|
| T1B | Tratamiento 1 Bayo |
| T1P | Tratamiento 1 Pinto |
| BH | Bayo hoja |
| BR | Bayo raíz |
| PH | Pinto hoja |
| PR | Pinto raíz |
| BMR | Bayo Madero raíz |
| BMH | Bayo Madero hoja |
| PSR | Pinto Saltillo raíz |
| PSH | Pinto Saltillo hoja |
| PPM | Plant preservative mixture |
| ABA | Ácido abscísico |
| LEA | Proteínas abundantes de embriogénesis tardía |
| IBT | Instituto de biotecnología, UNAM |
| MIP | Proteínas integrales |
| CMO | Colina monoxigenasa |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |

Índice de tablas

Tabla 1. Principales entidades productoras de frijol del país (SAGARPA, 2016)

Tabla 2. Contenido nutricional de frijol por cada 100 gramos (crudo).

Tabla 3. Componentes que conforman un medio de cultivo.

Tabla 4. Estudios realizados para obtención de callo *in vitro* de *Phseolus vulgaris*.

Tabla 5. Métodos de desinfección para las semillas Bayo Madero y Pinto Saltillo.

Tabla 6. Composición del medio FG-1 para germinación.

Tabla 7. Composición del medio para inducción y proliferación de callos FC-C y FC-1.

Tabla 8. Composición del medio para células en suspensión.

Tabla 9. Contrastes entre los tratamientos del ensayo 1 de raíz de peso fresco y hoja peso seco.

Tabla 10. Contrastes entre explantes de las dos variedades en base al tratamiento 1 del ensayo 1.

Tabla 11. Índices de crecimiento calculados para las dos variedades en el ensayo 1 de hoja y raíz y del ensayo 2 de raíz.

Tabla 12. Contrastes con base en el número de células totales en el ensayo 1 de ambos explantes y entre explantes.

Índice de imágenes

Imagen 1. Semillas proporcionadas por el IBT (A) variedad Bayo Mader y (B) Pinto Saltillo.

Imagen 2. Plántulas germinadas de la variedad (A) Bayo Madero y (B) Pinto Saltillo.

Imagen 3. Callo de los dos explantes (A) raíz y (B) hoja de la variedad Bayo Madero.

Imagen 4. Callos de los dos explantes (A) raíz y (B) hoja de la variedad Pinto Saltillo.

Imagen 5. Cultivo de la variedad Bayo Madero (A) cultivo inicial, (B) cultivo después de dos semanas de incubación.

Imagen 6. Cultivos celulares (A) Bayo Madero y (B) Pinto Saltillo.

Índice de figuras.

Figura 1. Raíz completamente desarrollada y nodulada de *Phaseolus vulgaris* (tomada por Yanet Tapia Garcia, 2016).

Figura 2. Tallo de *Phaseolus vulgaris*.

Figura 3. Triada ubicada en la axila de una hoja trifoliada, compuesta por dos yemas laterales y una central.

Figura 4. Componentes de una hoja trifoliada.

Figura 5. Hábito de crecimiento determinado arbustivo.

Figura 6. Componentes de la flor de *Phaseolus vulgaris* (CIAT, 1984).

Figura 7. Fruto de la planta de frijol.

Figura 8. Partes externas de la semilla de frijo (CIAT, 1984).

Figura 9. Curva de crecimiento típica: fase (A) Lag, (B) exponencial, (C) estacionaria y (D) muerte.

Figura 10. Metodología general.

Figura 11. Recuento de 5 cuadrantes grandes de cámara de Neubauer.

Índice de gráficos

Gráfico 1. Porcentaje de germinación con base a los métodos de desinfección empleados.

Gráfico 2. Porcentaje de formación de callo inducido en el medio FC-1.

Gráfico 3. Cinética de crecimiento con base al peso fresco de raíz del ensayo 1.

Gráfico 4. Cinética de crecimiento con base al peso seco de raíz del ensayo 1.

Gráfico 5. Cinética de crecimiento con base al peso fresco de hoja del ensayo 1.

Gráfico 6. Cinética de crecimiento con base al peso seco de hoja del ensayo 1.

Gráfico 7. Cinética de crecimiento con base al peso fresco comparando los dos explantes de las dos variedades del T1.

Gráfico 8. Cinética de crecimiento con base al peso seco comparando los dos explantes de las dos variedades del T.

Gráfico 9. Cinética de crecimiento con base el peso fresco de raíz del ensayo 2.

Gráfico 10. Cinética de crecimiento con base al peso seco de raíz del ensayo 2.

Gráfico 11. Número total de células de raíz del ensayo 1.

Gráfico 12. Número total de células de hoja del ensayo 1.

Gráfico 13. Número total de células comparando los dos explantes en las dos variedades en base al T1.

Gráfico 14. Porcentaje de células muertas de raíz del ensayo 1.

Gráfico 15. Porcentaje de células muertas de hoja del ensayo 1.

Gráfico 16. Número total de células de raíz del ensayo 2.

Gráfico 17. Porcentaje de células muertas de raíz del ensayo 2.

RESUMEN

La sequía es uno de los problemas principales para el establecimiento de cultivos como el frijol; la cantidad y la distribución de las precipitaciones son factores limitantes del cultivo por ello, a últimas fechas, se ha recurrido a técnicas moleculares y biotecnológicas como el cultivo de tejido vegetal como herramientas en programas de mejoramiento genético del cultivo. En el presente trabajo se utilizaron dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L), Bayo Madero (susceptible a sequía) y Pinto Saltillo (resistente a sequía), de las cuales se generaron callos a partir de raíz y hoja, dichos callos se sometieron a diferentes condiciones de estrés hídrico mediante la adición de PEG. Se caracterizaron los cultivos a través de las cinéticas de crecimiento de peso fresco y seco y no. de células muertas. La caracterización tuvo lugar en dos ensayos, uno probando dos concentraciones de PEG (0 y 20 %) y en el segundo ensayo se probaron 3 concentraciones de PEG (0, 20 y 30 %).

Para generar el callo, inicialmente se germinaron semillas bajo condiciones *in vitro* probándose dos métodos de desinfección siendo el más efectivo el método 2. Las semillas se sembraron en el medio de germinación FG-1, logrando tener un 50% de germinación para Bayo Madero y 10% para Pinto Saltillo. La formación de callo se logró en el medio FC-C para Bayo Madero y en FC-1 para Pinto Saltillo teniendo en ambos un 100% de formación de callo en sus respectivos medios y en ambos explantes.

Para la caracterización de los cultivos celulares, las dos variedades se establecieron en el medio FCC. En el ensayo 1 se evaluaron dos tratamientos de PEG, en los cuales se encontraron diferencias significativas en el peso fresco de raíz y el peso seco de hoja, donde hubo diferencias entre tratamientos y variedades. Comparando los explantes hubo diferencias significativas entre variedades al ser expuestas a condiciones de estrés hídrico. En el número de células hubo diferencias entre tratamientos de una misma variedad y entre los controles de las dos variedades en los dos explantes. El tratamiento 1 (20% PEG) de Pinto Saltillo raíz

fue el que presentó mayor porcentaje de células muertas, mientras que en hoja el tratamiento 1 de Bayo Madero fue el que tuvo mayor porcentaje.

En el ensayo 2 sólo se caracterizó el explante de raíz para ambas variedades, probando tres tratamientos de PEG, donde no se observaron diferencias significativas en cuanto al peso fresco y peso seco. En cuanto al número de células estadísticamente no se encontraron diferencias, pero se pudo observar en la cinética que el tratamiento 1 (20% PEG) y 2 (30% PEG) de Bayo Madero tienden a disminuir el número de células para el último día de la evaluación. El tratamiento 2 de Bayo Madero tuvo un mayor porcentaje de células muertas.

I. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se encuentra entre los cultivos más importantes por su producción y aprovechamiento para el consumo humano y animal así como para la industria alimentaria (Aguilera y Robles, 1975, INEGI, 1991, FAO, 1992, Foster, 1993, Maiti et al., 1996, Maiti, 1997), sin embargo el cultivo de frijol presenta varios problemas, tanto fitosanitarios como ambientales. El establecimiento de las plántulas es uno de los principales problemas en las regiones semiáridas a causa de una serie de factores relacionados con la semilla y su ambiente. Observaciones en campo en el Noreste de México mostraron que la sequía, salinidad y altas temperaturas son los principales problemas que afectan el establecimiento inicial, de frijol y otros cultivos.

En México, el frijol ocupa la cuarta posición en importancia por la superficie sembrada, después del maíz, pastos y sorgo. Durante el año agrícola 2015 se cosecharon 1.56 millones de hectáreas, de las cuales el 90.0 por ciento se cultivaron en condiciones de temporal. Debido a lo anterior, la cantidad y distribución de la precipitación es uno de los principales factores que afectan la productividad del cultivo. En la agricultura de secano (aquella en la que los cultivos solo reciben el agua que aportan las lluvias), la disponibilidad de agua es el principal factor limitante de la producción; la cantidad y distribución de la lluvia son las características más importantes en relación a la disponibilidad hídrica para el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos. La cantidad de lluvia es importante porque establece el balance hídrico durante el ciclo de los cultivos, y la distribución de la precipitación es importante porque la lluvia generalmente, se presenta en forma irregular, causando deficiencias hídricas en las plantas en las etapas críticas de desarrollo. Estas deficiencias hídricas se reflejan en una menor acumulación de materia seca y un periodo variable de tiempo para la diferenciación y desarrollo de los órganos reproductivos que dan origen al rendimiento, dependiendo de la duración e intensidad del estrés hídrico o sequía. Un ambiente con una distribución irregular de la lluvia durante el ciclo de las plantas afecta el crecimiento y desarrollo de los cultivos, sobre todo, cuando la sequía coincide con etapas críticas de desarrollo como son el máximo crecimiento vegetativo, el establecimiento del máximo número

de estructuras reproductivas y la formación del grano (López-Castañeda *et al.*, 2003). Por último un ambiente con un patrón modal de la lluvia durante la estación de crecimiento, que se caracteriza por presentar problemas de sequía terminal que coinciden principalmente con la etapa de llenado del grano, disminuyen considerablemente el peso de este componente del rendimiento (Passioura, 1977; Richards, 1991).

Por todo lo anterior, es necesario el desarrollo de técnicas para la selección de genotipos resistentes a estos factores de estrés (Maiti, 1996). La biotecnología vegetal resulta una herramienta óptima que ayuda en los programas de mejoramiento genético del frijol. Técnicas como el cultivo de tejidos se han convertido en una herramienta que ayuda en los programas de mejoramiento genético del frijol, pues permite el estudio de problemas relacionados con el crecimiento, desarrollo y diferenciación bajo condiciones ambientales controladas. En particular la técnica de cultivos de callos y células en suspensión *in vitro* brinda la oportunidad de estudiar las respuestas celulares, separadas de la respuesta de la planta completa, ya que se cuenta con la posibilidad de realizar ensayos sólo con células no diferenciadas, y evaluar la respuestas de estos cultivos celulares.

En este trabajo se planteó la utilización de cultivos celulares para evaluar las respuestas del crecimiento de dos variedades de frijol: Bayo Madero y Pinto Saltillo a partir de callos generados de dos explantes (hoja y raíz). Cultivos de células en suspensión se sometieron a estrés de sequía adicionando diferentes concentraciones (0 Y 20 %) de PEG (8000) y la respuesta del crecimiento se evaluó a través de cinéticas de crecimiento de peso fresco y seco, conteo y viabilidad celular.

II. ANTECEDENTES

2.1 El frijo (*Phaseolus vulgaris* L.)

Es un planta herbácea, autógama, dicotiledónea de ciclo anual, que se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas, característica que permite agruparla en las denominadas especies termófilas, dado que no soporta bajas temperaturas (Debouck e Hidalgo, 1985); se cultiva esencialmente para obtener semillas. Las características geográficas adecuadas para la producción del frijol son las siguientes:

Altitud: 0 a 2,400 msnm

Lluvia: 450 a 900 mm

Temperatura: 11 a 20 °C

Edafología: Suelos con texturas franco-arcillosos y franco-arenosos; profundidad de 60 cm, pH de 5.3-7.5 .

2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica del (*Phaseolus vulgaris* L.)

El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 35 especies, de las cuales cuatro se cultivan:

P. vulgaris L.

P. lunatus L.

P. coccineus L.

P. acutifolius A. Gray var. *latifolius* Freeman

El frijol es una planta originaria de Sudamérica, herbácea, anual la cual se adapta a diferentes condiciones climáticas y edáficas.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Orden : *Rosales*

Familia: *Leguminoseae*

Subfamilia: *Papilionoidae*

Tribu: *Phaseolae*

Subtribu: *Phaseolinae*

Genéro: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* Linneo

En cuanto a la morfología del frijol, esta especie presenta las siguientes estructuras:

Raíz. En la primera etapa de desarrollo el sistema radical esta formado por la radícula del embrión la cual se convierte posteriormente en la raíz principal. Las raíces secundarias, se desarrollan especialmente en la parte superior o cuello de la raíz principal, se encuentra de 3 a 7 de estas raíces en disposición de corona y tienen un diámetro menor que la raíz principal. Sobre la raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absobentes los cuales juegan un papel muy importante en la absorción de agua y nutrimentos (Figura 1) .



Figura1. Raíz completamente desarrollada y nodulada de *Phaseolus vulgaris* (tomada por Yanet Tapia Garcia, 2016)

Como miembro de la subfamilia Papilionoidae presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical. Estos nódulos tienen una forma poliédrica y un diámetro aproximado de 2 a 5 mm.

Tallo. Es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular. El tallo puede ser identificado como el eje central de la planta el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos. Se originan en el meristemo apical del embrión de la semilla; desde la germinación en las primeras etapas de desarrollo de la planta, este meristemo tiene una fuerte dominancia apical y en su proceso de desarrollo genera nudos. Un nudo es el punto de inserción de las hojas (o de los cotiledones) en el tallo. El ángulo formado entre el tallo y el pecícolo de las hojas se denomina axila; en las axilas aparece un complejo de yemas que luego se desarrollan como ramas laterales y/o como inflorescencias (Figura 2).



Figura 2. Tallo de *Phaseolus vulgaris*

Ramas y complejos axilares. Las ramas se desarrollan a partir de un complejo de yemas localizado siempre en las axilas formadas por el pulvínulo (base foliar o foliolar engrosada) de una hoja y el tallo o la rama; también en la inserción de los cotiledones. Éste es el denominado complejo axilar (Figura 3) que generalmente está formado por tres yemas visibles del cual además de ramas se pueden desarrollar otras estructuras como las inflorescencias; el predominio de ramas y/o

inflorescencias depende del hábito de crecimiento y de la parte de la planta considerada.

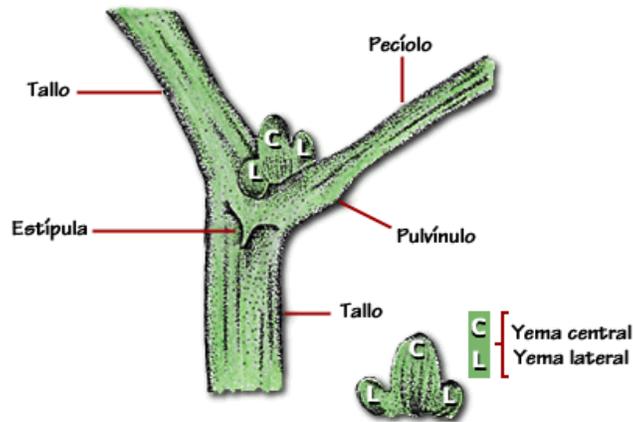


Figura 3. Tríada ubicada en la axila de una hoja trifoliada, compuesta por dos yemas laterales y una central.

Hojas. Están insertadas en los nudos del tallo y las ramas. En dichos nudos siempre se encuentran estípulas (estructura que se forma a cada lado de la base foliar de una planta) que constituyen un carácter importante en la sistemática de las leguminosas. Las hojas del frijol son de dos tipos simples, las cuales aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis. Caen antes de que la planta esté completamente desarrollada. Y las hojas compuestas (Figura 4), que son trifoliadas (tres folíolos), con pecíolo (centro de unión de la lámina con el tallo) y un ráquis (eje de la hoja). El folíolo central o terminal es simétrico y acuminado, los dos laterales son asimétricos y también acuminados.

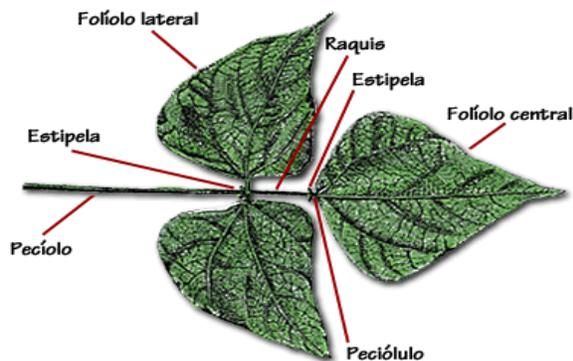


Figura 4. Componentes de una hoja trifoliada.

Inflorescencia. Desde el punto de vista botánico se considera como racimo de racimos: es decir un racimo principal compuesto de racimos secundarios, los cuales se originan de un complejo de tres yemas que se encuentra en las axilas formadas por las brácteas primarias y el raquis. En la axila de cada bráctea primaria existe un complejo de yemas denominado triada floral (Figura 5).

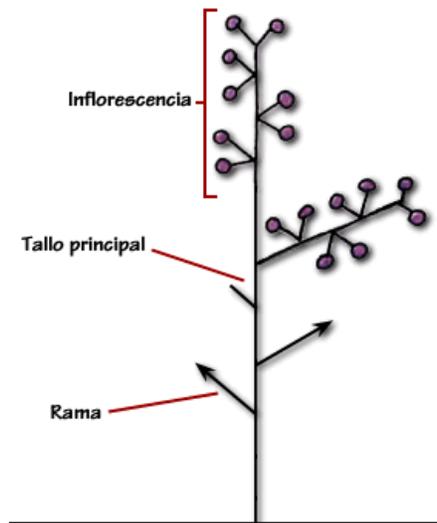


Figura 5. Hábito de crecimiento determinado arbustivo.

Flor. La flor del frijol es una típica flor papilionácea (Figur 6). En el proceso de desarrollo de dicha flor se pueden distinguir dos estados; el botón floral y la flor completamente abierta. El botón floral, bien sea que se origine en las inserciones de un racimo o en el desarrollo completamente floral de las yemas de una axila, en su estado inicial está envuelto por las bracteolas que tienen forma ovalada o redonda.

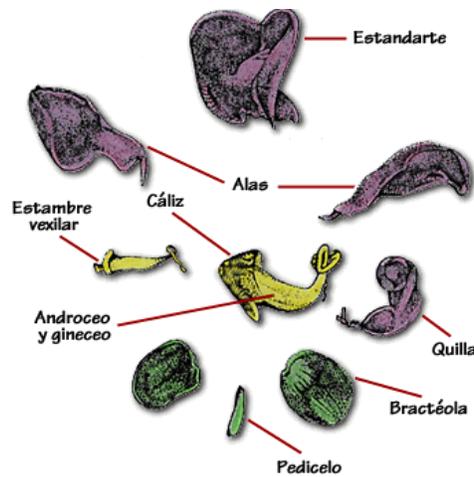


Figura 6. Componentes de la flor de *Phaseolus vulgaris*, fuente CIAT (1984)

Fruto: El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Puesto que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como leguminosa. Dos suturas aparecen en la unión de las dos valvas: una es la sutura dorsal, llamada placentar; la otra sutura se denomina sutura ventral (Figura 7). Las vainas son generalmente glabras o subglabras con pelos muy pequeños; a veces la epidermis es cerosa. Pueden ser de diversos colores, uniformes o con rayas, existiendo diferencias entre las vainas jóvenes o estado inmaduro, las vainas maduras y las vainas completamente secas. El color depende de la variedad.

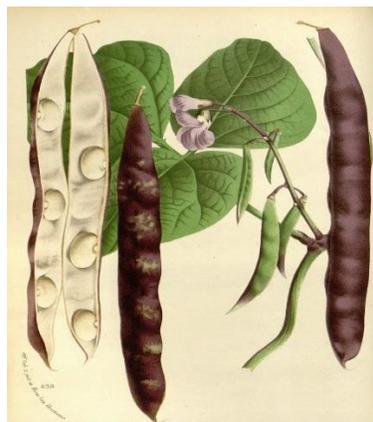


Figura 7. Fruto de la planta de frijol (Van Houtte, 1867-1868.)

Semilla. La semilla es exalbuminosa es decir que no posee albumen, por lo tanto las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. Puede tener varias formas: cilíndrica, de riñón, esférica u otras.

Las partes externas más importantes de la semilla son: La testa o cubierta, que corresponde a la capa secundaria del óvulo (Figura 8.). El hilum, o cicatriz dejada por el funículo, el micrópilo que es una abertura en la cubierta o corteza de la semilla cerca del hilum. A través de esta abertura se realiza principalmente la absorción de agua. La rafe, proveniente de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo campilótropo.

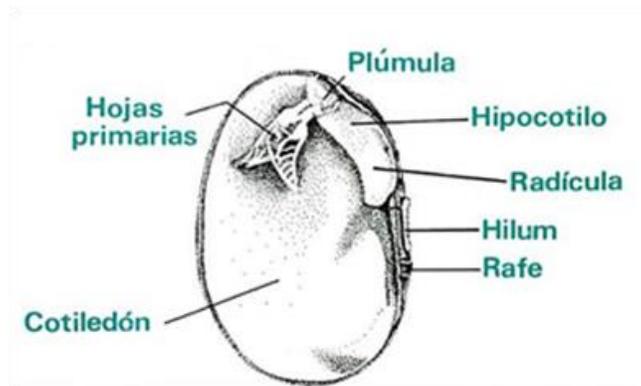


Figura 8. Partes externas de la semilla de frijol, fuente CIAT (1984)

Internamente la semilla está constituida solamente por el embrión el cual está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocotilo, los dos cotiledones y la radícula.

2.1.2 Origen y distribución del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El género *Phaseolus* incluye cinco especies domesticadas: *P. vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima), *P. acutifolius* (frijol tépari), *P. coccineus* ssp. *coccineus* (frijol ayocote) y *P. dumosus* = *P. polyanthus* (= *P. coccineus* ssp. *darwinianus*) (frijol de año) (Freytag y Debouck, 2002). Los primeros trabajos sobre el origen y evolución del frijol se remontan a Miranda-Colín (1967) y Gentry (1969), quienes afirmaron que la forma silvestre de frijol se encuentra en Mesoamérica. Los restos más

antiguos de *P. vulgaris* se encontraron en el continente Americano, en dos áreas geográficas lejanas: Mesoamérica y los Andes (Kaplan, 1965; Kaplan et al., 1973).

Kaplan (1965) estableció que *P. vulgaris* se domesticó en el Valle de Tehuacán, Puebla, México hace aproximadamente 7000 años, probablemente en asociación con el maíz. En Perú se recuperaron restos de *P. vulgaris*, con características similares a las formas actuales cultivadas de frijol. Esto indica que Perú pudo ser uno de los primeros centros de domesticación del frijol. El análisis de los restos de plantas con base en la prueba del 14C indicó que la edad media del *P. vulgaris* domesticado es de 7680 ± 280 años (Kaplan et al., 1973).

Las investigaciones realizadas coinciden en identificar el origen del frijol en Mesoamérica, concretamente en México, desde Jalisco hasta Oaxaca, y de ahí la especie migró a Sudamérica. El aislamiento geográfico dio lugar a dos acervos genéticos: el Andino y el Mesoamericano. También sugieren al norte Andino como un tercer centro de domesticación (Koenig y Gepts, 1989; Singh et al., 1991a; Singh et al., 1991b; Islam et al., 2002a; Islam et al., 2002b; Chacón et al., 2005). Los datos de aloenzimas, faseolinas, lecitinas e inhibidores de α -amilasa, diferencian el acervo Andino del Mesoamericano, y detectan variabilidad adicional en el Norte Andino que no se encuentra en los dos sitios anteriores.

Las evidencias aportadas por estudios con enfoques arqueológico, morfológico-agronómico, bioquímico y molecular, indican que el frijol tiene su centro de origen en la región de Mesoamérica, particularmente en el occidente y sur de México y que hubo dos centros de domesticación: uno primario (Mesoamérica) y otro secundario (Sur Andino). Las evidencias actuales no permiten discernir claramente al Norte Andino como un centro de domesticación adicional.

2.1.3 Importancia económica y nutrimental

Importancia económica

La producción mundial de frijol creció a una tasa promedio anual de 1.6 por ciento entre 2003 y 2014, para ubicarse en 25.1 millones de toneladas. En siete países se concentró el 63.0 por ciento de la producción mundial de frijol en 2014: India (16.4%), Myanmar (14.9%), Brasil (13.1%), Estados Unidos (5.3%), México (5.1%), China (4.1%) y Tanzania (4.1%).

El frijol es el cuarto cultivo en importancia por la superficie sembrada en México, después del maíz, pastos y el sorgo, por el valor de la producción primaria que genera, ocupa la undécima posición. Por su amplia adaptación y por el número de variedades mejoradas disponibles, el cultivo de esta leguminosa se realiza prácticamente en todas las regiones, condiciones climáticas y tipos de suelos en el país excepto en Sinaloa. El clima y la disponibilidad de agua son los factores más importantes que determinan la productividad del cultivo, ya que las principales regiones productoras registran bajos niveles de precipitación pluvial y además con una distribución errática. En todos los estados de la República Mexicana se siembran más de 70 variedades entre las que destacan: los claros, negros, pintos y flores (SAGARPA, 2016).

El promedio en volumen de la producción nacional en los años 2006-2015 fue de 1,087 toneladas ocupando el cuarto lugar a nivel mundial (1, 294,634), Zacatecas ocupa el primer lugar en superficie sembrada y volumen de producción, que representan 34.8% y 29.9% respectivamente, del total nacional, siendo en el último trimestre del año donde se cosechan dos terceras partes de la producción anual. El consumo anual per cápita en el país es de 8.4 kg.

Los principales productores se presentan en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Principales entidades productoras de frijol del país (SAGARPA, 2016)

| Rank | Entidad federativa | Volumen (toneladas) | Variación (%) 2014-2015 |
|------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| | Total nacional | 969,146 | -23.9 |
| 1 | Zacatecas | 289,533 | -18.6 |
| 2 | Durango | 111,626 | -41.9 |
| 3 | Chihuahua | 96,051 | -23.0 |
| 4 | Sinaloa | 84,399 | -47.7 |
| 5 | Chiapas | 60,045 | -2.2 |
| 6 | Guanajuato | 55,347 | -2.9 |
| 7 | San Luis Potosí | 45,024 | -24.7 |
| 8 | Puebla | 41,411 | -3.9 |
| 9 | Oaxaca | 27,660 | -0.8 |
| 10 | Nayarit | 26,633 | -51.4 |
| | Resto | 131,416 | -3.1 |

Fuente: Atlas Agroalimentario, SAGARPA (2016)

El nivel de disponibilidad interna de frijol y distintas preferencias por variedades de la leguminosa, determina que México tenga oferta exportable y efectúe compras externas. Dos terceras partes de las exportaciones mexicanas son compradas por Estados Unidos, principalmente de variedades claras; mientras que el 90 % de las importaciones proviene de ese país. Reino Unido, Indonesia y Pakistán son potenciales compradores de este grano, importan cada uno, en promedio anual, tres veces de lo que México exporta.

Importancia nutrimental

En México, el frijol es considerado un producto tradicional para el desarrollo rural del país, por lo que han formado parte de la dieta y de la economía. Su consumo en la actualidad muestra una tendencia a la baja ya que hace 30 años, su ingesta se calculó en 16 kg per cápita, y actualmente este número ha descendido a 10 kg, debido a que el modelo nutricional ha cambiado, al incrementarse el consumo de comestibles de alto contenido calórico (grasa de origen animal y almidones procesados), además de la sustitución de proteína de origen vegetal por proteína

de origen animal; tendencia que puede deberse a factores como migración, aumento en la concentración urbana, cambios en el poder adquisitivo de las familias y a la incorporación de las mujeres en el ámbito laboral.

Las leguminosas son el tercer grupo más abundante de plantas en el mundo, para la FAO, éstas forman el grupo de semillas secas y bajas en grasa, y han sido adoptadas en todo el mundo como principal fuente de proteínas y minerales; además su aporte de aminoácidos esenciales es complementario al de los cereales. Las semillas pueden almacenarse por largos periodos sin perder su valor nutricional, por otra parte, su producción mejora la calidad de la tierra donde se cultivan a través de la función de fijación de nitrógeno, favoreciendo la agricultura sustentable.

El frijol es una gran fuente de proteínas, carbohidratos y fibra, además de fitoquímicos (Tabla 2). El frijol cuenta con compuestos que pueden ejercer un efecto benéfico en la salud, entre los más estudiados se encuentran los fenólicos los cuales cuentan con diferentes propiedades, como lo es su capacidad antioxidante (reducción del estrés oxidativo del cuerpo), además de neutralizar los compuestos mutagénicos (aquéllos que alteran la secuencia genética y que podrían desencadenar la generación de cáncer) y sus propiedades anticancerígenas. La fibra dietética es el compuesto de mayor abundancia en el frijol y una de sus propiedades consiste en disminuir el nivel de azúcar en la sangre, además, puede absorber el colesterol durante su paso por el sistema digestivo, lo cual disminuye su nivel en la sangre (Leyva L *et al.*,2016) . Los inhibidores de tripsina confieren protección contra rotavirus, inhiben la carcinogénesis y pueden ser utilizados como agentes quimiprotectores, es decir, para proteger al organismo contra efectos secundarios de tratamientos de ciertas enfermedades.

Tabla 2. Contenido nutricional del frijol por cada 100 gramos (crudo)

| MACRONUTRIENTES | | MINERALES | |
|------------------------------------|------------|--------------------|---------|
| Calorías | 333 | | |
| Fibra | 4.3g | Calcio | 228 mg |
| Grasas | 1.8g | Fósforo | 407 mg |
| Proteínas | 19.2 g | Hierro | 5.5 mg |
| Carbohidratos | 61.5 g | Magnesio | 140 mg |
| Lípidos | | Sodio | 24 mg |
| Grasas totales | 1.8 g | Potasio | 1406 mg |
| Colesterol | 0,0 mg | Zinc | 2.79 mg |
| Saturados totales | 0.12 g | | |
| Monoinsaturados (oleico) | 0.06 g | | |
| Poliinsaturados (linoleico) | 0.18 g | | |
| VITAMINAS | 0.0 µg | AMINOÁCIDOS | 927 mg |
| Retinol | 0.62 mg | Isoleucina | 1685 mg |
| Tiamina | 0.14 mg | Leucina | 1593 mg |
| Riboflavina | 1.7 mg | Lisina | 234 mg |
| Niacina | 0.4 mg | Metionina | 1154 mg |
| Piridoxina | 394 µg | Fenilalanina | 878 mg |
| Ácido fólico | | Treonina | 223 mg |
| | | Triptófano | 1016 mg |
| | | Valina | 1257 mg |
| | | Arginina | 627 mg |
| | | Histidina | |

Datos tomados de la revista Ciencia y Desarrollo, CONACYT, 2016.

2.1.4 Variedades de frijol

Existen más de 70 variedades de frijol que han sido agrupados de acuerdo con su color en: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. Las variedades más consumidas son azufradas, mayocoba, negro Jamapa, peruano, flor de mayo y flor de junio. Les siguen en preferencia el garbancillo, manzano,

negro San Luis, negro Querétaro y pinto. En el presente trabajo se utilizaron dos variedades: Bayo Madero y Pinto Saltillo

a) Bayo Madero

Es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado con tallos y ramas débiles y semirectos, las guías son cortas, sin capacidad para trepar (Schoonhoven *et al.*, 1987). La floración se inicia a 35-44 días después de la siembra (dds) y la madurez fisiológica a los 79-112 dds. Esta variedad se obtuvo a partir del cruzamiento entre las líneas mejoradas (C-12-159-2-4-1-3-1-3) y (II952-M186-5-2) de la colección Bayo Criollo Calera, posteriormente se realizó selección masal (Acosta, 1982). Bayo Madero es una variedad tolerante a antracnosis, roya, tizón común y tizón de halo es susceptible a la sequía y llega a presentar rendimientos de 604 a 1499 kg.ha⁻¹ (Rosales *et al.*, 2014; Acosta, 1982).

b) Pinto Saltillo

Pinto Saltillo proviene de una cruce múltiple, donde intervinieron las variedades Hidalgo 77, MAM 30, Michoacán 91A, BAT 76, BAT 93 y G5653. Esta variedad se obtuvo como resultado de la colaboración entre el INIFAP y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), llevada a cabo con el propósito de obtener variedades resistentes a enfermedades como son: Antracnosis, Roya, Tizón Común, Tizón de Halo y Pudriciones de la Raíz; además de lograr variedades de grano de tipo comercial y con tolerancia a sequía.

Es una variedad de hábito de crecimiento de guía, con una altura promedio de 32 cm; alcanza la floración y madurez fisiológica, respectivamente, entre los 62 y 70 y 115 y 123 días después de la siembra, en riego, y entre los 48 y 100 días en temporal. Pinto Saltillo es sensible al fotoperiodo y si se siembra en condiciones de riego cuando los días son largos y cálidos (cerca de 14 h de luz solar y temperaturas superiores a 25°) se incrementa la duración de sus etapas de

desarrollo, por lo que es posible observar una duración del ciclo biológico entre 110 y 150 días. Su grano es de tipo pinto, de color crema claro con pintas café claro; el tamaño del grano es mediano y es altamente resistente a la oxidación.

La baja precipitación que caracteriza al sureste de Coahuila, que oscila de 150 a 280 mm de lluvia, exige variedades eficientes en el uso del agua. Pinto Saltillo ha demostrado repetidamente su capacidad de producción, aún en reducidas condiciones de lluvia, en comparación a las variedades tradicionales de este cultivo. (<http://biblioteca.inifap.gob.mx>).

2.2 El Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetal es una herramienta biotecnológica importante en la selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de horticultura, forestales así como frutales. Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre la identificación de las auxinas como reguladores naturales de crecimiento vegetal y la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas.

Esta herramienta hace referencia al conjunto de técnicas usadas para hacer crecer las células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas controladas y libres de microorganismos (Street 1977, Calva y Rios 1999). Se basa en el principio de totipotencialidad, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto el potencial para regenerar una nueva planta completa (Feri y Paul 2000). En algunos casos las células conformarán una masa aparentemente desorganizada, conocida como callo, en otros estarán presentes otras estructuras reconocibles como tallos, órganos, raíces, bulbos u otros órganos, así como embriones somáticos.

El cultivo de tejidos vegetales permite el estudio de problemas básicos relacionados con el crecimiento y diferenciación bajo condiciones altamente reproducibles,

particularmente el cultivo de callo *in vitro* brinda la oportunidad de estudiar las respuestas celulares separadas de la respuesta de la planta completa.

2.2.1 Factores que modulan la morfogénesis

Los medios de cultivo son una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para germinar, multiplicar, aislar o regenerar tejidos o células según corresponda esto bajo condiciones favorables de pH y temperatura, los cuales pueden ser sólidos o líquidos. Sus componentes modulan la expresión de los genes, en especial los reguladores de crecimiento y proveen los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo.

Estos medios nutritivos están constituidos principalmente por: macronutrientes los cuales cumplen funciones vitales como la fotosíntesis y respiración, micronutrientes encargados de la regulación enzimática, compuestos orgánicos como fuente de carbono, vitaminas las cuales actúan como precursoras de coenzimas, hormonas que *in vivo* son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan (Seabrook 1980, Yasuda et al 1972), reguladores de crecimiento, los cuales son compuestos que tienen un efecto similar a las hormonas pero son sintetizados artificialmente y muchos de ellos molecularmente son distintos a las hormonas, agentes gelificantes como agar o gelificantes a base de polímeros inertes, y en algunas ocasiones se emplea el uso de antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado y PVP entre otros) en cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles cuya oxidación produce oscurecimiento y eventualmente la muerte del explante. En la Tabla 3 se describen detalladamente la función y ejemplos de estos componentes que conforman un medio de cultivo.

Tabla 3. Componentes que conforman un medio de cultivo.

| Componentes | Ejemplos | Funciones |
|-----------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Macronutrientes | N ₂ | Forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y algunas coenzimas. |
| | K | Regulador de potencial osmótico. |
| | Mg ²⁺ | Cofactor de enzimas y componente de la clorofila. |
| | S | Cofactor |
| | P | Intermediarios en fotosíntesis y respiración |
| | Ca ²⁺ | Síntesis de pared celular. |
| Micronutrientes | Mo | Componente de nitrato reductasa |
| | Cu ²⁺ | Transferencia de electrones |
| | Zn ²⁺ | Síntesis de auxinas |
| | Mn | Cofactor de enzimas fotosintéticas |
| | Fe ²⁺ | Transferencia de electrones y componente del citocromo. |
| | Co | Componente de algunas vitaminas y enzimas. |
| | I ₂ | Estimula la nitrificación |
| | B Na | Mantemiento en la pared y membrana celular Osmorregulación y equilibrio eléctrico. |
| | Cl | Osmorregulación y liberación de O ₂ a partir de H ₂ O ₂ |
| | Ni | Movilización de nitrógeno durante la germinación |
| Compuestos orgánicos | Azúcar | Fuente de carbono |
| | Manitol | |
| | Sorbitol | |

| | | |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | Incrementa la presión osmótica, transformándola en hipotónica, dando lugar a la salida del líquido. |
| Vitaminas | Tiamina (B ₁) | Componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico. |
| | Piridoxina(B ₆) | Biotransformación |
| | Riboflavina(B ₂) | Necesaria para el crecimiento de las raíces |
| | Ácido nicotínico(B ₃) | Metabolismo energético |
| | <i>Myo</i> -inositol | Mensajero secundario |
| Reguladores de crecimiento | Auxinas <ul style="list-style-type: none"> • 2,4-D • AIA • AIB • ANA | Promueven la elongación celular, la división celular, la formación de raíces laterales, desarrollo de frutos, diferenciación del tejido vascular. En CTV se emplea para promover la inducción y crecimiento de callo, formación de brotes y raíces y la embriogénesis somática |
| | Citocininas <ul style="list-style-type: none"> • BA • Kinetina | Regulan el ciclo celular, estimulan la morfogénesis y el crecimiento de yemas laterales, promueven la división celular y la formación de cloroplastos, también rompen la dominancia apical. En CTV se emplean para estimular la división celular, formación de brotes y maduración de cloroplastos. |
| | Giberelinas <ul style="list-style-type: none"> • AG₃ | Induce el alargamiento de entrenudos en tallos al estimular la división y elongación celular, retrasa la maduración de los frutos, estimula el crecimiento de los frutos. En CTV se utiliza para el alargamiento de brotes adventicios, la germinación de semillas y, en algunos casos estimula la maduración y germinación de embriones somáticos |

| | | |
|----------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Ácido abscisico | Estimula el cierre estomático, inhibe el crecimiento del tallo, en las semillas induce la síntesis de proteínas de almacenamiento, induce el efecto de las giberelinas así como la senescencia de las hojas, induce y mantiene la latencia. En CTV poco se utiliza, sin embargo se ha visto que ejerce un efecto sobre la maduración y sincronización de embriones somáticos. |
| Antioxidantes | PVP | Facilidad para formar complejos, restaurando la actividad de las enzimas reaccionando con los fenoles, los cuales son adsorbidos a través de uniones de hidrógeno. |
| | Carbón activado | Mediante su adición al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos. Remueve sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclaveado. |
| | Ac. Cítrico/ ac. Ascórbico | Actúan como compuestos que inhiben o demoran la oxidación, a través de la descomposición de especies reactivas de oxígeno, evitando así las reacciones en cascada de los radicales libres. |

a) Explante

El éxito de la inducción y el establecimiento del cultivo de callos y en consecuencia de la subsiguiente regeneración a tejidos y plantas, depende, en gran medida de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre (genotipo, estado fisiológico, posición del tejido dentro de la planta, estacionalidad, etc.). El explante es una porción del tejido, órgano o células de las que se inicia un cultivo *in vitro* vegetal.

Las plantas jóvenes o en desarrollo que contengan tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma planta se puedan encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta, además de que pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menor células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos *in vitro* (Calva y Rios 1999, Seabrook 1980, Street 1977). Las células meristemáticas se distinguen de otras células por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiamétrica, pared celular delgada, mínima vacuolación y un gran núcleo (Doerner 2000). En los cultivos *in vitro* este tipo de células se encuentran en la periferia de los callos o en las suspensiones como masas o nódulos de tejidos preembriogénicos, lo que produce una gran variabilidad en la expresión genética entre la población celular de esos cultivos.

Condiciones de incubación

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones.

La temperatura, las condiciones de luz (tipo de luz, intensidad y fotoperiodo), la humedad relativa y el intercambio gaseoso permiten regular procesos morfológicos. Para el correcto crecimiento y desarrollo del tejido en cultivo en general es necesario el suministro de luz, pero a intensidades muy bajas, mucho más que la de la luz solar. La acumulación en las plantas de la energía de los carbohidratos provendrá de los azúcares agregados al medio, más que de la fotosíntesis, de manera que son innecesarios altos niveles de luz. La temperatura controlada también es necesaria para estabilizar el crecimiento y mejorar la predictibilidad del desarrollo de los tejidos.

La temperatura de los cultivos generalmente se contralan entre 25 y 28 °C, el pH entre 5.2-6.5 y la luz de 0 a 12,000 lux (Calva y Rios 1999, Seabrook 1980, Martin 1980, Yasuda et al 1972).

2.2.2 Cultivos de callos y células en suspensión

Cultivo de callos

El cultivo de callos es la inducción y mantenimiento de una masa amorfa de células vegetales sin especialización, se da como consecuencia de un cambio en los niveles de auxinas y citocininas (Perez-Molphe y col., 1999). El callo es una masa amorfa no diferenciada de células, obtenida por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados los cuales, posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular.

Los tejidos de callo por lo general son heterogéneos en su composición celular; es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares, la diversidad celular depende de varios factores como el origen del tejido, edad, composición de los medios. Hay estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Petiard y Bariaud 1985, Holden et al., 1988). Pero aún más callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos (Lindsey y Yeoman 1983, Bhom 1982, Calva y Rios 1999).

El callo puede volverse progresivamente friable (disgregable), es decir, que sus células se separan fácilmente, con subcultivos repetidos en el medio. Un callo disgregable es altamente deseable para establecer una suspensión de células en medio líquido. La friabilidad del callo también puede ser inducida mediante la modificación del contenido de reguladores de crecimiento del medio (Bhojwani y Dantu, 2013).

Células en suspensión

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Los medios óptimos para la inducción y crecimiento de callos a partir de explantes primarios no son los mismos que para el establecimiento de suspensiones celulares; el nivel óptimo de auxinas y citocininas, p.ej., pueden ser diferentes (Torrey *et al.*, 1961).

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que están en movimiento continuo, los cuales se incuban en agitación a 80-150 rpm, y en condiciones de fotoperiodo o de oscuridad. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días. El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es sin duda un callo friable, con una tasa de división celular. La selección de células aptas para crecer en suspensiones celulares se puede efectuar, en un medio sólido, mediante el plaqueo de una suspensión recién comenzada, para continuar únicamente con la suspensión de colonias de células friables y de rápido crecimiento (Wilson *et al.*, 1975).

En su iniciación, las suspensiones celulares constan de grandes agregados y de células libres, alargadas y enormes, que no se dividen; pero después de repetir los subcultivos es factible obtener una suspensión celular finamente dispersa con alto ritmo de crecimiento. Estas suspensiones poseen pequeños agregados de células pequeñas, isodiamétricas, con paredes finas y citoplasma denso.

Evaluación del crecimiento de los cultivos celulares

Hay numerosos métodos para determinar el crecimiento de las suspensiones celulares (Street, 1977), los más utilizados son:

Número de células: Parámetro de crecimiento el cual es utilizado como un método de medición que requiere disgregar los grupos celulares en células individuales. El conteo posterior se puede realizar en cámara de Neubauer, realizando las observaciones en un microscopio óptico.

Volumen celular: En este método se requiere tomar un volumen conocido de la suspensión y se centrifuga durante 3 min a 200 g para provocar una sedimentación de las células; posteriormente se determina el volumen de éstas y se expresa en ml de células por ml de cultivo.

Peso fresco: Sobre un papel filtro previamente pesado se colocan las células lavadas con agua destilada y se pesan.

Peso seco: Se determina de manera similar al de peso fresco, pero antes de pesar las células se secan a 60°C, durante 12 h como mínimo.

Cinética de crecimiento: Permite describir el comportamiento de un cultivo celular mediante el peso fresco o peso seco, la cual consiste en obtener una gráfica de variación del peso en función del tiempo, la cual da origen a una curva sigmoidea o semi sigmoidea que representa el crecimiento celular vegetal (figura 11)

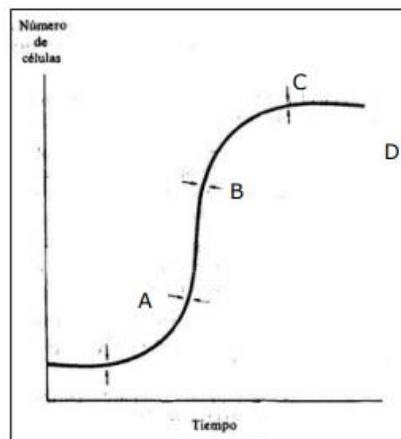


Figura 9. Curva de crecimiento típica: A Lag; B exponencial; C Estacionaria; D muerte.

En las curvas de crecimiento se pueden encontrar 4 fases características:

- *Fase Lag o fase de adaptación*: el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. El objetivo de esta fase es preparar a las células para el proceso de división celular (Pérez & Sánchez, 2010).
- *Fase exponencial*: durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece

aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente.

- *Fase estacionaria*: durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de auto sombreado).
- *Fase de muerte*: la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Además se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular (concentración, recuento celular, etc.).

Para determinar algunas características del crecimiento de la biomasa, se pueden calcular algunos parámetros como el índice de crecimiento, la velocidad específica del crecimiento y el tiempo de duplicación (Arias, 2009).

Índice de crecimiento (IC): Se obtiene con la relación del peso de la biomasa en la fase exponencial entre el peso inicial.

$$IC = \frac{X - X_0}{X_0}$$

Velocidad específica del crecimiento (μ). Relación de la cantidad de biomasa en el tiempo que dura la fase exponencial, se expresa en g / día.

$$\mu = \frac{\ln \frac{X}{X_0}}{t - t_0}$$

Tiempo de duplicación celular (t_d). Tiempo en el que la biomasa se duplica, se expresa en días.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En donde:

$X_0 = \text{Biomasa inicial}$ $t_0 = \text{tiempo en el que inicia la fase exponencial}$

$X = \text{Biomasa final}$ $t = \text{tiempo en el que finaliza la fase exponencial}$

Modelos biológicos

Los modelos biológicos actúan como modelos vivos sobre los cuales se pueden estudiar nuevas funciones biológicas o realizar pruebas experimentales para obtener información acerca de otras especies que son más difíciles de estudiar directamente y que tienen similitudes con el modelo biológico (Pyke, 2009)

Características

Para que un organismo se considere modelo biológico en cultivo de tejidos vegetales debe cubrir algunas características principales como (Marsch, 2010):

- Que sea fácil de mantener y reproducir en el laboratorio
- Ciclo de vida relativamente corto
- Un fenotipo sencillo de observar o medir
- Reproducción autógena, autocompatible y con descendencia numerosa.

a) Ejemplos

El cultivo de tejidos vegetales cuenta con varios modelos biológicos, los cuales se han ido caracterizando mejor y han sido seleccionados como modelos para la investigación básica. Algunos ejemplos de modelos biológicos son:

Arabidopsis thaliana: *Arabidopsis* presenta varias regiones duplicadas y familias génicas numerosas en comparación con otros organismos (Marsch Martínez y de Folter, 2010). Su tamaño es pequeño (30 cm), por lo que es posible crecer un gran número en un espacio reducido. Su ciclo de vida es relativamente corto (seis a ocho semanas). Tiene una abundante producción de semillas (más de 10,000 semillas por planta). Es diploide y se auto fecunda, lo cual facilita mantener líneas y realizar cruces controladas.

Physcomitrella patens. Es un organismo genéticamente estable cuyo genoma ha sido completamente secuenciado. Puede crecer bajo condiciones fotoautotróficas en medio de cultivo simple basado en agua, minerales esenciales, luz y bióxido de carbono (Hohe y Reski, 2003). Es el único organismo entre las plantas multicelulares que puede insertar exitosamente en su genoma, segmentos foráneos de DNA por recombinación homóloga. Al ser un organismo predominantemente haploide, permite observar los fenotipos mutantes inmediatamente después de la transformación genética con una eficiencia de 95%. Con base en lo anterior, ha sido un sistema robusto y eficiente para la producción de proteínas recombinantes por medio de recombinación homóloga (Decker y Reski 2004).

Pseudocrossidium replicatum: Es una especie de gran interés biotecnológico debido a que es un organismo altamente tolerante a la deshidratación, en la categoría más alta de acuerdo al protocolo de Austin (Wood y Jenks, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que los gametóforos toleran varios ciclos de hidratación-deshidratación. En condiciones de cultivo *in vitro*, las esporas de *P. replicatum* germinan a pesar de estar en condiciones de estrés osmótico severo (hasta 600 mM de Sorbitol).

Distichlis spicata: Se reproduce principalmente mediante rizomas y puede encontrarse en ambientes altamente estresantes como desiertos, los cuales se encuentran sujetos a temperatura, sequía o en pantanos salinos donde las raíces son periódicamente inundadas con agua de mar. Su habilidad para crecer en diversos hábitats sugiere que es una de las especies vegetales que tiene habilidad para adaptarse a un gran número de factores ambientales (Enberg y Wu, 1995).

2.2.3 Cultivos de callos y células en suspensión del Frijol

Diferentes autores se han dedicado a la investigación, para generar cultivos de callo *in vitro*, probando diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, para posteriormente utilizarlos como modelos de estudio. En la Tabla 4 se presentan algunos de los trabajos más relevantes que se han realizado para obtener cultivos *in vitro* de callos.

| Autor | Explanete | Reguladores | Resultados |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ruiz <i>et al.</i> (1985) | Meristemas Hipocotilo | Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) +Vitamina B ₅ 2,4-D, ANA, BA | Mayor cantidad de callo Callo de mayor tamaño |
| Peters, et al . (1977) | Anteras | Medio Veliky & Martin 2,4-D (1 mg/l) ANA (1 mg/l) AIA (2 mg/l) Kinetina (0.2 mg/l) | Formación de callo |
| Cardenas Avila, M.L, (2001) | Hipocotilo Hoja cotiledonaria Cotiledón Raíz | Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 2,4-D (1.5, 2.0, 2,4-D (10, 15 y 20 mg/l) 3.0, 5.0, 10 mg/l) | Formación de callos friables de color blanco a amarillo sin oxidación, las mejores concentraciones para cada explanete son: Hipocotilo 3mg/l Cotiledon 10 mg/l Holo cotiledonaria 5 mg/l Raíz sin formación de callo |
| Lazaro Ponciano, L. (2013) | Hojas verdaderas Tallo Yemas axilares | Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 2,4-D(0.5 mg/l) BAP (1.2 mg/l) | Formación de callo, en combinacion de los dos reguladores utilizados. |

Tabla 4 . Estudios realizados para la obtención de callo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris*

2.2.4. Cultivos celulares *in vitro* bajo condiciones de estrés hídrico.

Los cultivos celulares o células en suspensión son una herramienta de gran ayuda para entender el comportamiento de las células, cuando éstas se encuentran sometidas a algún tipo de estrés biótico o abiótico. En la actualidad no hay muchos estudios sobre el estudio de células *in vitro* bajo estrés hídrico, para *Phaseolus vulgaris*.

La mayoría de los estudios respecto a estrés hídrico en células en suspensión se han realizado en tomate y papa. Corcuera y colaboradores de la Universidad de Santiago, Chile (1988) investigaron el metabolismo de la prolina en células en suspensión bajo estrés hídrico de *Solanum tuberosum*, en donde encontraron que al aplicar un estrés con PEG 600 al 10 % en las células de la papa tenían un incremento en la concentración de prolina que va de 2.3 a 20.71 $\mu\text{mol} / \text{g}$ de masa seca. A pesar de esta acumulación de prolina en células de papa estresadas no se detectaron cambios *in vitro* en la actividad de las enzimas claves de las rutas metabólicas básicas que se pensaba estaban implicadas en la biosíntesis de prolina. Los resultados se discutieron en términos de cambios inducidos por el estrés hídrico en el estado fisicoquímico del citoplasma, estos cambios probablemente alteran la eficacia de las cadenas de reacción multi enzimáticas implicadas en la biosíntesis de prolina.

Bressan, *et al.*, 1980 de la Universidad de Purdue en Estados Unidos, estudiaron células de tomate (*Lycopersicon esculentum*) con capacidad para crecer en presencia de estrés hídrico, las cuales se obtuvieron por exposición de células cultivadas en un medio con PEG, estas células presentaron un aumento 14 veces mayor en el crecimiento bajo estrés comparado con las células que nunca habían sido expuestas a este estrés. La mayor resistencia se presentó cuando las células crecieron en presencia de PEG, pero ésta se perdió cuando estas mismas células se transfirieron a un nuevo medio sin agente estresante. Las células resistentes inducidas por PEG también mostraron una mayor resistencia a NaCl, sugieren que esta adaptación es como un mecanismo probable por el cual aumenta la resistencia.

Fallon y Philips en 1989 estudiaron las respuestas a estrés hídrico en células adaptadas y no adaptadas de células en suspensión de zanahoria. Las células cultivadas en suspensión a estrés hídrico inducido por PEG, se estudiaron después de la transferencia de estas a medio que contenía PEG a diferentes concentraciones entre el 0 y 25 %. Se evaluaron características de crecimiento, el potencial osmótico celular y los cambios en las concentraciones de solutos orgánicos en células no adaptadas y líneas celulares adaptadas, teniendo como resultado una disminución en el peso fresco y seco en las células no adaptadas con un potencial decreciente, mientras que el peso seco no se vio afectado en las líneas adaptadas. Se observó un ajuste osmótico sustancial en las líneas adaptadas, debido al aumento de glucosa, fructosa y sacarosa, la concentración de prolina aumentó hasta 40 veces en las líneas adaptadas y 12 veces en células no adaptadas, otros aminoácidos como alanina, histidina y arginina mostraron respuestas similares aunque más pequeñas. Las poliaminas y la glicina-betaína no aumentaron significativamente en células adaptadas y no adaptadas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento a través de cinéticas de crecimiento de peso seco y peso fresco, conteo y viabilidad celular de cultivos celulares, sometidos a condiciones de estrés hídrico mediante la adición de PEG de dos variedades de la especie de frijol *Phaseolus vulgaris* L. (Bayo Madero y Pinto Saltillo).

3.2 Objetivos particulares

- Germinación *in vitro* de semillas de las dos variedades de frijol; Bayo Madero y Pinto Saltillo
- Inducción de callos de las dos variedades y explantes (hoja y raíz)
- Proliferación de callos de las variedades y explantes
- Establecimiento de los cultivos celulares (células en suspensión) de las variedades y explantes
- Caracterización de los cultivos celulares mediante los siguientes parámetros:
 - Cinéticas de crecimiento: peso fresco y peso seco
 - Conteo y viabilidad celular

IV. HIPÓTESIS

Las respuestas fisiológicas y bioquímicas serán diferentes en las dos especies, debido a que la variedad Pinto Saltillo ha demostrado que puede seguir creciendo aún en condiciones de sequía, mientras que la variedad Bayo Madero se considera susceptible a este estrés.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del dpto. de Bioquímica, de la Facultad de Química. El material biológico fue proporcionado por la Dra. Helena Porta del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para el cumplimiento de los objetivos, la parte experimental se llevó a cabo como se presenta en el siguiente diagrama (Fig.10)

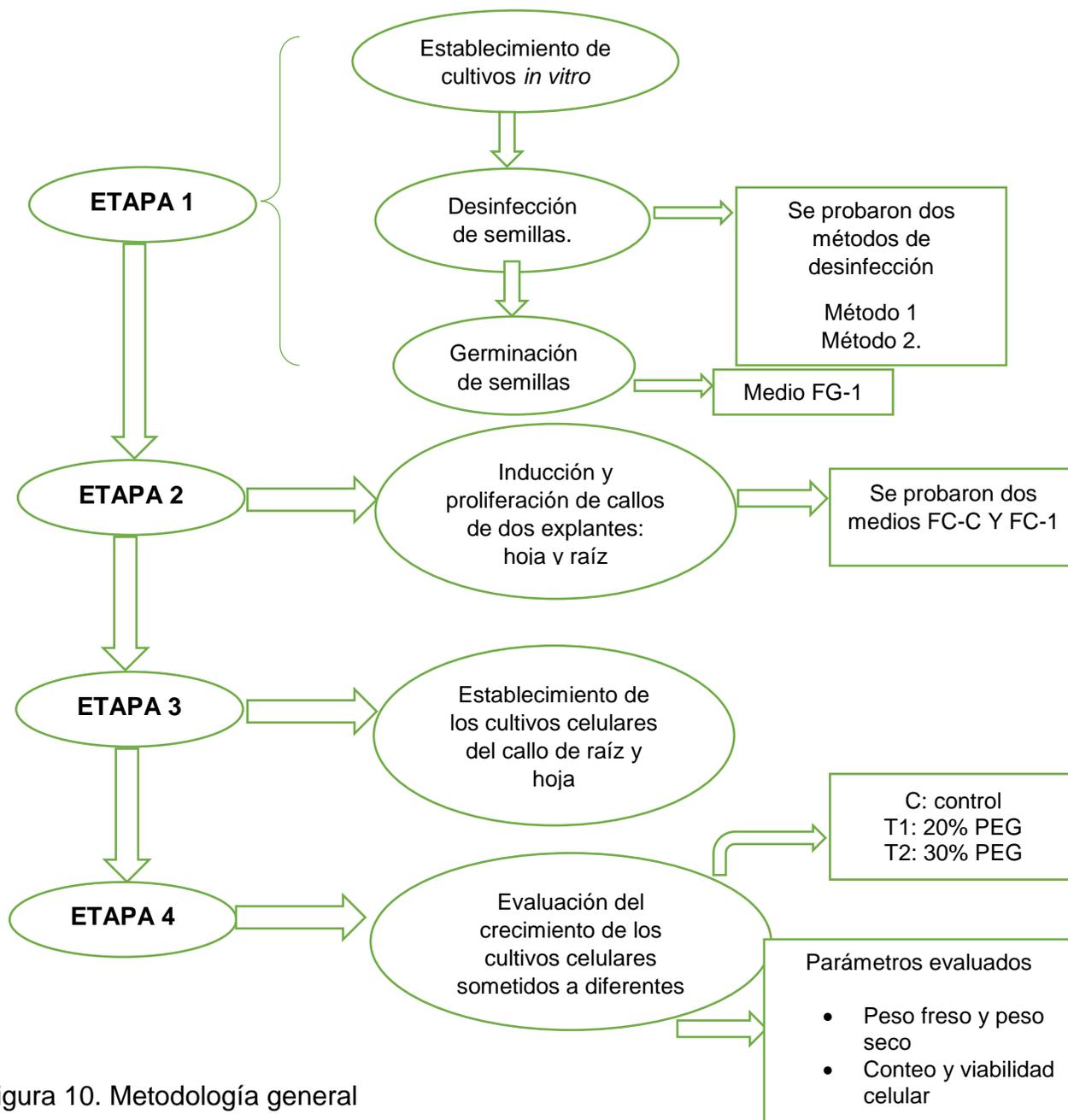


Figura 10. Metodología general

5.1 Material biológico

Como material biológico se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de dos variedades: Bayo Madero y Pinto Saltillo



Imagen 1. Semillas proporcionadas por el IBT (A) Variedad Bayo Madero y (B) Variedad Pinto saltillo

5.2 Preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X de sales inorgánicas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementados con vitaminas R2 (vitamina MS modificadas) (Anexo 1), sacarosa al 3% así como diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento según el ensayo a realizar. El pH se ajustó a 5.7 utilizando NaOH 1N o HCL 1N según fuera necesario en todos los medio de cultivo, como agente gelificante se utilizó gelzan a razón de 3.3 g.L⁻¹.

Los medios de cultivo se sirvieron en frascos de alimento infantil agregando 30 mL por frasco (inducción y proliferación) o en frascos de 1 L a razón de 100 ml de medio de cultivo (germinación). Todos los medios se autoclavearon a 122 °C con una presión de 1.2 Kg/ cm² durante 18 min.

5.3 Condiciones de incubación

Los frascos de germinación, inducción y proliferación se incubaron en un cuarto de ambiente controlado con fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad y a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, todos los cultivos de inducción y proliferación se subcultivaron cada tres semanas a medio fresco.

Las células en suspensión se incubaron en un cuarto de ambiente controlado de fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, se mantuvieron en agitación constante en una incubadora a 100 rpm.

5.4 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos

Desinfección de semillas

En una campana de flujo laminar las semillas de las dos variedades se desinfectaron en frascos de 1 L sumergiéndolas en las soluciones y tiempo descritos en Tabla 5, en cada etapa fueron enjuagadas con agua desionizada estéril hasta retirar el exceso del agente desinfectante.

Tabla 5. Métodos de desinfección para las semillas Bayo Madero y Pinto saltillo

| Agente Desinfectantes | Método 1 | Método 2 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Alcohol etílico al 70 % | 1 min | 1min |
| Solución de hipoclorito de sodio al 15 % (v/v) + 3 ml/250 ml de una solución coloidal de plata (Microdyn) y tween 20 0.5 ml/250 ml | 15 min con agitación | 12 min con agitación |
| Solución de Agrimicín (4 g/ L) | 15 min con agitación | 10 min con agitación |

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Solución de Benomil (4 g/L) | 15 min con agitación | 10 min con agitación |
| Remojo de 24 h con agua, cefotaxime (250 mg/L) y nistatina (50 mg/L) | AG3 (3 mg/L) PPM (10 ml) | AG3 (1 mg/L) |

Siembra y germinación de semillas

Las semillas se sembraron en frascos de 1 L en el medio FG-1 (Tabla 6). Al 50 % de los frascos se le agregó antibiótico (250 mg·L⁻¹) y el resto fueron sin antibiótico. Todas semillas sembradas se incubaron en condiciones de fotoperiodo bajo las condiciones ya descritas.

Tabla 6. Composición del medio FG-1 para germinación

| COMPONENTES | CANTIDAD (1L) |
|--------------------------------|---------------|
| SALES DEL MEDIO MS | 100 % |
| GLICINA | 1 mg |
| AIB | 1 mg |
| AIA | 1mg |
| BA | 1 mg |
| VITAMINAS R₂ | 100 % |
| MANITOL¹ | 20 g |
| GELZAN | 3.3 g |
| SACAROSA | 30 g |
| PH | 5.7 |
| CEFOTAXIME | 50 mg |
| NISTATINA | 75 mg |
| PPM² | 10 ml |

¹ Sólo para la variedad Pinto Saltillo, ² Solo para el método de desinfección 1

5.5 Inducción y proliferación de callos

La inducción de callo se llevó a cabo de dos explantes de las plantas germinadas. Se disectaron hojas (1 cm²) y raíces (0.3 a 0.5 cm) de ambas variedades y se sembraron en medio FC-1 (Tabla 7). Se incubaron bajo las mismas condiciones que la germinación.

Tabla 7. Composición de medio para inducción y proliferación de callos FC-C y FC-1.

| COMPONENTES | CANTIDAD (1 L) | |
|---------------------------|----------------|-------|
| | FC-C | FC-1 |
| SALES DEL MEDIO MS | 100 % | 100 % |
| VITAMINA R2 | 100 % | 100 % |
| GLICINA | 1 mg | 1 mg |
| ANTIOXIDANTE ¹ | 10 ml | 10 ml |
| 2,4-D | 1 mg | 2 mg |
| ANA | | 1 mg |
| AIB | | 1 mg |
| BA | 1 mg | 1 mg |
| PVP | 1 g | 1 g |
| SACAROSA | 30 g | 30 g |
| GELZAN | 3.3 g | 3.3 g |
| pH | 5.7 | 5.7 |
| CEFOTAXIME | 50 mg | 50 mg |
| NISTATINA | 75 mg | 75 mg |

¹ El antioxidante se preparó con 50 mg/100 ml tanto de ácido ascórbico como ácido cítrico.

Cada tres semanas se realizaron los subcultivos de los callos, eliminando las partes oxidadas y los restos de tejidos que quedaron. De la variedad Bayo Madero se contaba con callo previamente establecido en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetal, el cual se siguió subcultivando junto con el callo recién inducido, ambos se utilizaron en la caracterización. De la variedad Pinto Saltillo todo el callo se originó de las plantas germinadas *in vitro*.

5.6 Cultivos de células en suspensión

Ensayo 1

Una vez que se proliferaron los cultivos de callo, se establecieron los cultivos celulares en suspensiones de las dos variedades y de los dos explantes, para lo cual se pesaron 4 g del callo, inoculando matraces Erlenmeyer de 250 ml con 60 ml del medio fresco líquido (Tabla 8) y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm y fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad a una temperatura de 25°C ±2°C durante dos semanas.

Tablas 8. Composición del medio para células en suspensión (FCC)

| COMPONENTES | CANTIDAD (1L) |
|--------------------|---------------|
| SALES DEL MEDIO MS | 100 % |
| VITAMINAS R2 | 100 % |
| GLICINA | 1 mg |
| BA | 1 mg |
| 2,4-D | 1 mg |
| ANTIOXIDANTES | 10 ml |
| PVP | 1 g |
| SACAROSA | 30 g |
| PH | 5.7 |

Ensayo 2

Para el establecimiento del cultivo madre de las células en suspensión, en este ensayo sólo se utilizó el explante de raíz para las dos variedades Bayo Madero y Pinto Saltillo, siguiendo el mismo procedimiento y las mismas condiciones de incubación del ensayo 1, obteniendo al final un total de 4 matraces Erlenmeyer de 250 ml para cada variedad.

5.7 Ensayo de estrés hídrico

Ensayo 1

Trascurridas dos semanas de incubación de los cultivos madre, se procesaron para obtener las suspensiones celulares como a continuación se describe:

- Se juntaron los cultivo madre (tres matraces de 250 ml) en un vaso de precipitado estéril, se filtraron a través de una gasa estéril para eliminar los callos que no se disgregaron .
- La suspensión se transfirió a una probeta estéril de 250 ml y se aforó a un volumen final de 180 ml con medio líquido fresco.
- Posteriormente se transfirieron 60 ml de la nueva suspensión homogeneizada a los mismos matraces de 250 ml.
- Por último, para determinar la densidad celular de las suspensiones, se tomó 1 ml de la suspensión de cada matraz y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml previamente pesados, se realizó por triplicado, después se centrifugaron a 13,000 rpm durante 12 min, se retiró el sobrenadante y se volvieron a pesar los tubos ya con el paquete celular. La densidad celular se calculó por diferencia de peso.

Con el objetivo de determinar una densidad específica para todos los matraces, en los ensayos, se calculó la cantidad de suspensión que debía tomarse para inocular los matraces con medio, para ello se realizaron los siguientes cálculos para ambos explantes, para cada variedad.

1. Calcular V_1

$$V_1 = \frac{v_m D_2}{(D_1 - D_2)} \quad \text{Donde: } \begin{aligned} V_1 &= \text{volumen requerido} \\ V_m &= \text{volumen del medio fresco} \\ D_1 &= \text{densidad celular madre} \\ D_2 &= \text{densidad celular deseada} \end{aligned}$$

2. Tomar el volumen V_1 del cultivo madre y aforarlo a 180 ml con medio líquido fresco.

Una vez obtenida la misma densidad en los explantes se procedió a realizar lo siguiente:

- Se juntaron los matraces con las suspensiones celulares para obtener un total de 180 ml. Esta suspensión se dividió en dos partes iguales de 90 ml (control y PEG), colocándose en vasos de precipitados estériles,
- Se añadieron 30 ml de medio fresco para el control, 30 ml de medio fresco + PEG para el tratamiento de estrés.
- Por último se dividió la suspensión celular en matraces de 125 ml estériles con 40 ml cada uno de suspensión. Teniendo así tres matraces (repeticiones) por tratamiento.

Ensayo 2

Transcurridas las dos semanas de incubación se realizó un cultivo de células siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- Se filtró el cultivo madre (6 matraces de 250 ml) en un vaso de precipitados con una gasa, ambos estériles.
- La suspensión filtrada se midió en una probeta y se aforó con medio fresco nuevo a 360 ml.
- La suspensión se vertió (30 ml) en tubos Falcon previamente pesados.
- Los tubos Falcon se centrifugaron a 1500 rpm durante 6 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se pesaron de nuevo los tubos para obtener la cantidad (g) de células.
- Se inoculó .1 g de células en matraces de 125 ml adicionando 15 ml del medio líquido según el tratamiento (0, 20, 30 % PEG)
- Al final se obtuvieron 36 matraces de 125 ml, 12 matraces para cada tratamiento, para evaluar su crecimiento durante 2 semanas.

5.8 Caracterización de las líneas celulares

5.8.1 Peso fresco y peso seco

Ensayo 1

Para poder obtener las cinéticas de crecimiento de peso fresco y seco, cada tercer día se tomaron alícuotas de 1 ml de la suspensión celular de cada repetición de cada tratamiento, se depositaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml previamente pesados, posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante con una jeringa estéril de 3 ml teniendo cuidado de no dañar el paquete celular, por último se volvieron a pesar los tubos. Se calculó el peso fresco por diferencia de peso (g/ml). Para la determinación de peso seco, las muestras utilizadas en el peso fresco se dejaron secar a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante.

Ensayo 2

Los parámetros que se evaluaron en el ensayo 2 fueron los mismos que en el ensayo 1, sin embargo, el peso fresco y el peso seco se midieron de forma distinta. Donde se tomaron alícuotas de 10 ml de la suspensión celular depositándolos en tubos Falcon de 50 ml previamente pesados, posteriormente se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante con una jeringa estéril de 5 ml teniendo cuidado de no dañar el paquete celular, por último se volvieron a pesar los tubos. Se calculó el peso fresco por diferencia de peso (g/ml). Para la determinación de peso seco, las muestras utilizadas en el peso fresco se dejaron secar a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante.

5.8.2 Conteo y viabilidad celular (Ensayos 1 y 2)

Se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión celular y se colocó en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min, después se retiraron 500 µl con una pipeta, se agitó la muestra manualmente para deshacer el paquete celular. Para el conteo celular se tomó una alícuota de 10 µl, se colocó en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo en un microscopio óptico con el objetivo de 10X. La viabilidad se determinó agregando 50 µl de una solución de azul de Evans al 0.5% (v/v) a los tubos que se ocuparon para el conteo, se agitó la muestra para homogeneizar la suspensión posteriormente se tomó una alícuota de 10 µl y se colocó en la cámara de Neubauer, el conteo de células teñidas se hizo en un microscopio óptico con el objetivo 10X. Para ambos casos se contaron las células presentes en los 5 cuadrantes que tiene la cámara de Neubauer (Fig.11)

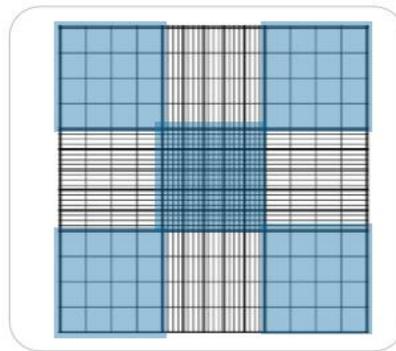


Figura 11. Recuento de 5 cuadros grandes de cámara de Neubauer

El número de células totales se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (ml)}}$$

Para este caso la alícuota que se tomó fue en µl sólo se realizó la conversión de éste a ml. Donde 1 µl= 0.001 ml

VI. RESULTADOS

6.1 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos

Desinfección y germinación de semillas.

Para el establecimiento aséptico de los cultivos, se probaron dos métodos de desinfección en las semillas de las dos variedades. En el método 1 no hubo germinación de ninguna semilla para ambas variedades mientras que en el método 2 se obtuvo 50 y 10 % de germinación para las variedades Bayo Madero y Pinto Saltillo respectivamente (Imagen 2). En ninguno de los métodos se presentaron problemas de contaminación.

En la imagen 4 se presentan las plántulas que lograron germinar después de 30 días usando el método de desinfección 2 y el medio FG-1, correspondiente a las dos variedades.

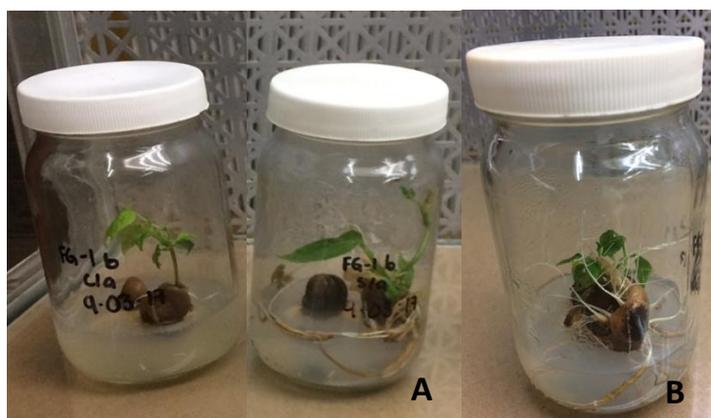


Imagen 2. Plántulas germinadas de la variedad (A) Bayo Madero y (B) Pinto saltillo

Los porcentajes de germinación obtenidos después de emplear los dos métodos de desinfección de las dos variedades se pueden observar en el gráfico 1.

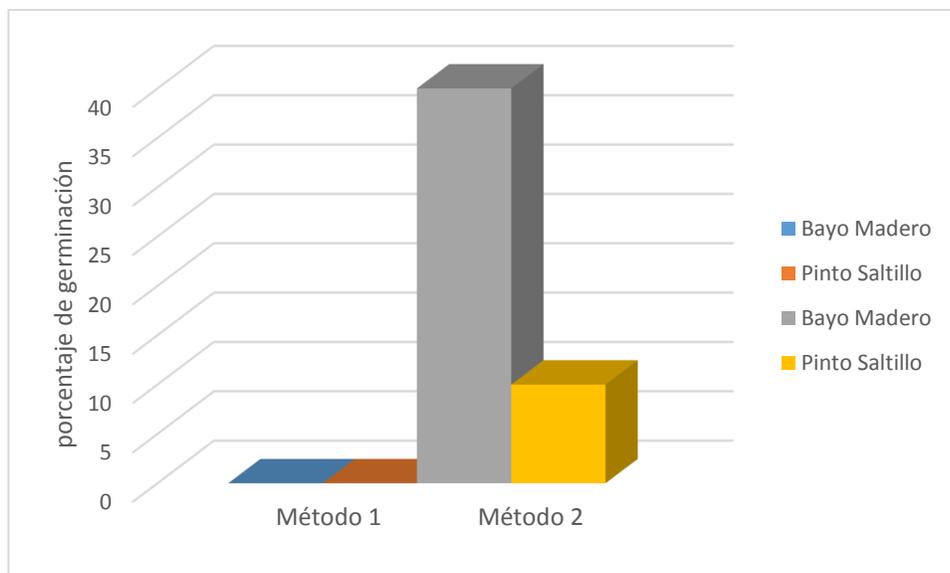


Gráfico 1. Porcentaje de germinación en base a los métodos de desinfección empleados.

6.2 Inducción y proliferación de callos

Los explantes que se obtuvieron de las plantas germinadas de las dos variedades, se indujeron a callo en el medio FC-1 obteniendo un 100 % de los explantes con formación de callo (gráfico 2), tanto en las dos variedades como en los dos explantes. Los callos obtenidos se proliferaron subcultivándose cada tres semanas a medio fresco. El callo viejo y nuevo de la variedad Bayo Madero se proliferó muy bien en el medio FC-C. En el caso de la variedad Pinto Saltillo los callos se proliferaron en el medio FC-1 en el cual se observó un mejor crecimiento, mientras que en el medio FC-C no se logró generar callo

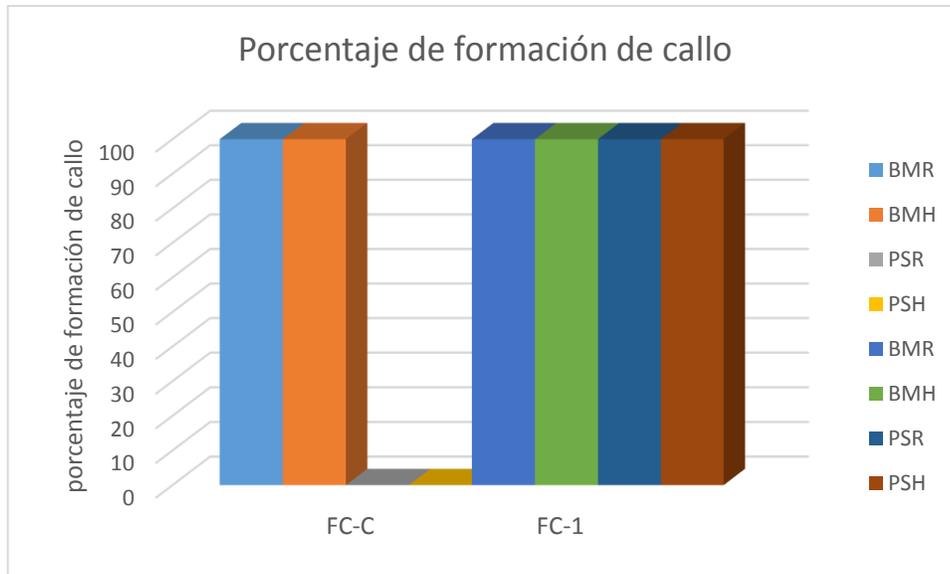


Gráfico 2 . Porcentaje de formación de callo inducido en el medio FC-C y FC-1

Los callos obtenidos de la variedad Bayo Madero (Imagen 3) del explante de raíz y hoja presentaron una morfología compacta, firme y friable, así como una coloración de amarillo- verde para el caso de raíz y un color blanco- café para hoja.

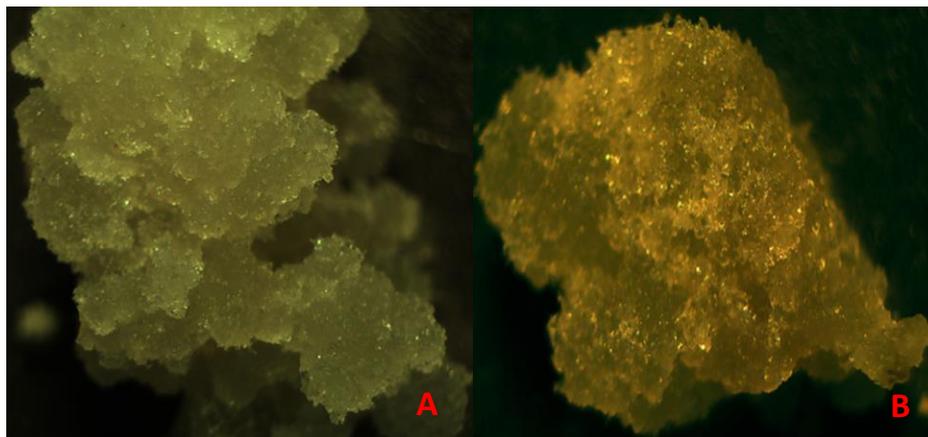


Imagen 3. Callo de los dos explantes. (A) Raíz y (B) Hoja de la variedad Bayo Madero

Los callos obtenidos de la variedad Pinto Saltillo (Imagen 4) del explante de raíz y hoja presentaron una morfología firme, fácilmente disgregable, friable, se pueden ver hidratados, así como una coloración de amarillo- café para ambos explantes.

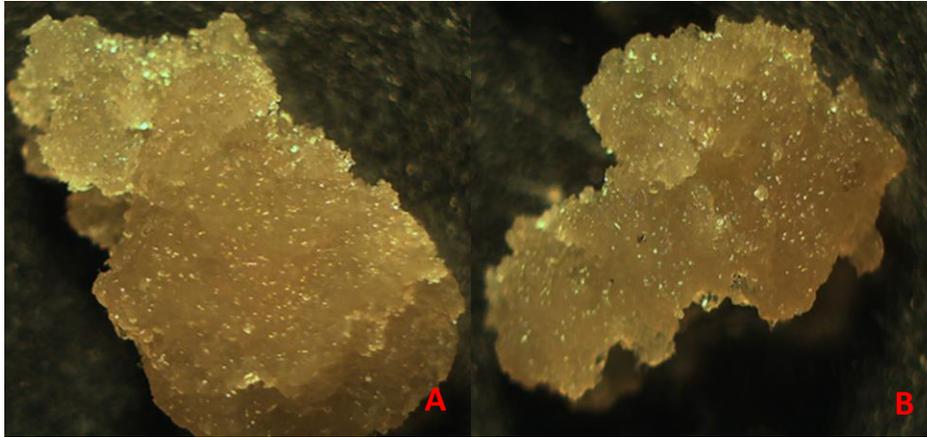


Imagen 4. Callo de los dos explantes. (A) Raíz y (B) Hoja de la variedad Pinto Saltillo

6.3 Cultivo de células en suspensión

Ensayo 1

En la Imagen 5 se pueden observar los cultivos madre de la variedad Bayo Madero y los cultivos de la misma variedad después de dos semanas de incubación en las condiciones descritas anteriormente.



Imagen 5. Cultivo madre de la variedad Bayo Madero (A) cultivo inicial, (B) cultivo después de dos semanas de incubación.

Ensayo 2

En la imagen 6 se observan los cultivos obtenidos con base al procedimiento del ensayo 2 para el establecimiento de células en suspensión, obteniendo al final un total de 12 matraces de 125 ml para cada tratamiento (C,T1 y T2) y cada variedad, la evaluación de los parámetros se hizo por duplicado.



Imagen 6. Cultivos celulares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) ; (A) Bayo Madero y (B) Pinto Saltillo.

6.4 Caracterización de las líneas celulares

6.4.1 Peso fresco y peso seco

Ensayo 1

En el gráfico se presenta el peso fresco de las dos variedades del explante de raíz evaluado durante 2 semanas, en el cual se puede observar que en el caso de la variedad Bayo tanto el control como en el tratamiento 1 presentan dos ciclos celulares, para el tratamiento T1, el máximo peso se registra el día 7 (primer ciclo) y disminuye hasta el día 9, sin embargo, vuelve a aumentar al día 11 (segundo ciclo) sin lograr ganar el mismo peso inicial. En el tratamiento 1, los callos de raíz de la variedad Bayo madero presentan una disminución hasta el día 4 (primer ciclo) y un aumento que se registra el día 7 donde inicia el segundo ciclo, pero disminuye sin aumentar más el peso fresco. Para la variedad Pinto Saltillo el control, al igual que Bayo madero presenta dos ciclos celulares, alcanzando su peso fresco máximo el día 7 y disminuyendo éste el día 4 y 9 sin registrarse otro aumento y al final de la evaluación no logra alcanzar su peso inicial, en el caso del tratamiento con PEG, en el caso de la variedad Pinto Saltillo, disminuye el peso fresco y se registra un aumento muy discreto sin llegar a ser significativo y sólo se observa un ciclo de crecimiento. En el caso de Bayo Madero se presentan dos ciclos celulares y disminuye el peso fresco por debajo del peso inicial.

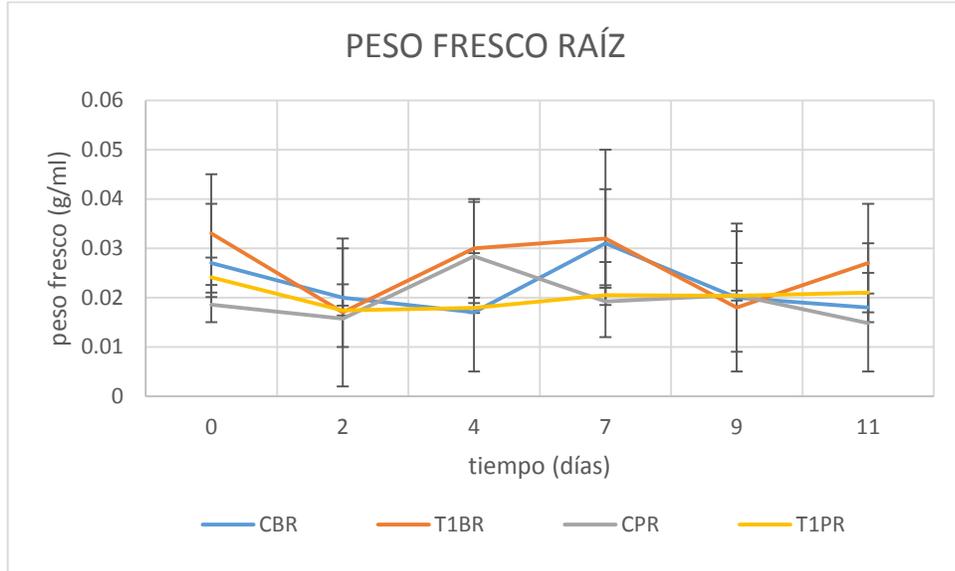


Gráfico 3. Cinética de crecimiento con base al peso fresco de raíz del ensayo 1

En el caso de peso seco (Gráfico 4) el comportamiento tanto en Bayo Madero como en la variedad Pinto Saltillo es igual que en el peso fresco, observándose dos ciclos celulares tanto en el control como en el tratamiento T1 para Bayo madero y el control de Pinto Saltillo mientras que en el T1 de Pinto no se presentan dos ciclos celulares y tampoco se observa un incremento significativo durante todo el tiempo de observación.

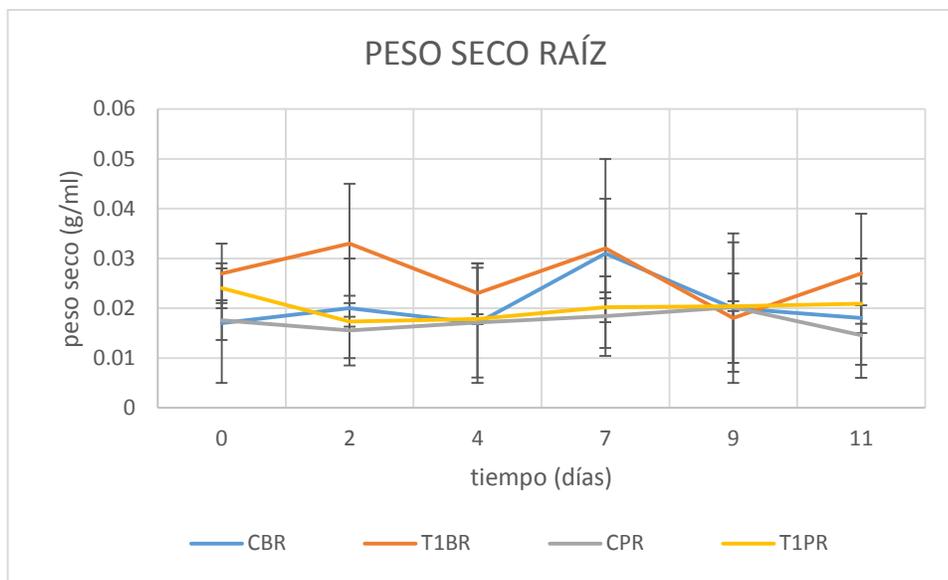


Gráfico 4. Cinética de crecimiento con base al peso seco de raíz del ensayo 1.

En los gráficos 5 y 6 se presentan los datos de la evaluación del crecimiento con base al peso fresco y peso seco respectivamente, de los callos generados de segmentos de hoja de las dos variedades. Se puede observar que el tratamiento 1 de la variedad Bayo Madero presenta un mayor peso fresco y seco hasta el día 7 y después decae en el día 9 para mantenerse constante hasta el día 11, el control de hoja de Bayo fue el que presenta un menor peso fresco y seco, el peso de Pinto Saltillo en el tratamiento 1 se mantiene constante hasta el día 7, para el día 9 presenta un aumento del peso el cual posteriormente disminuye para el día 11, por último el control de Pinto tuvo un crecimiento durante los 11 días sin registrarse una disminución del peso.

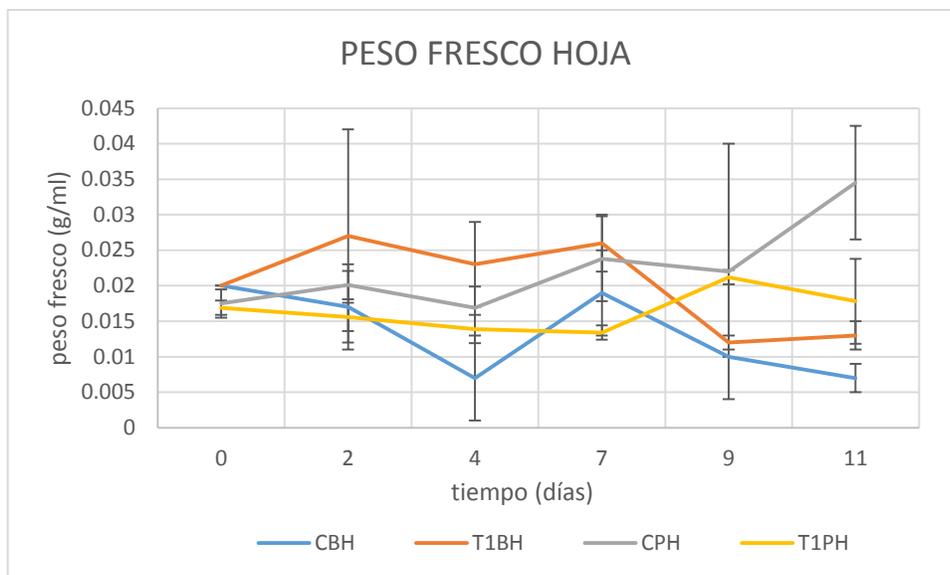


Gráfico 5. Cinética de crecimiento con base al peso fresco de hoja del ensayo 1

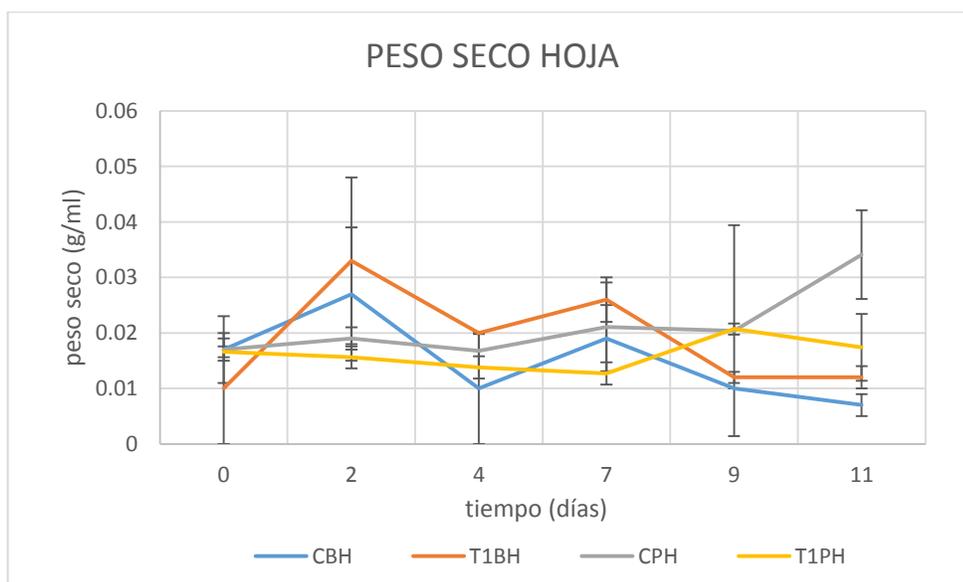


Gráfico 6. Cinética de crecimiento con base al peso seco de hoja del ensayo 1

También se analizaron los resultados de peso fresco (Gráfico 7) y peso seco (Gráfico 8), comparando los dos explantes de las dos variedades que fueron sometidos al T1, observándose que el explante de raíz de la variedad Bayo

Madero fue el que tuvo un mayor valor de peso fresco, mientras que el que obtuvo el menor valor fue el explante de hoja para la misma variedad. En la variedad Pinto saltillo al comparar los dos explantes se puede observar que no hay una diferencia, estos valores se mantienen constantes a lo largo del tiempo.

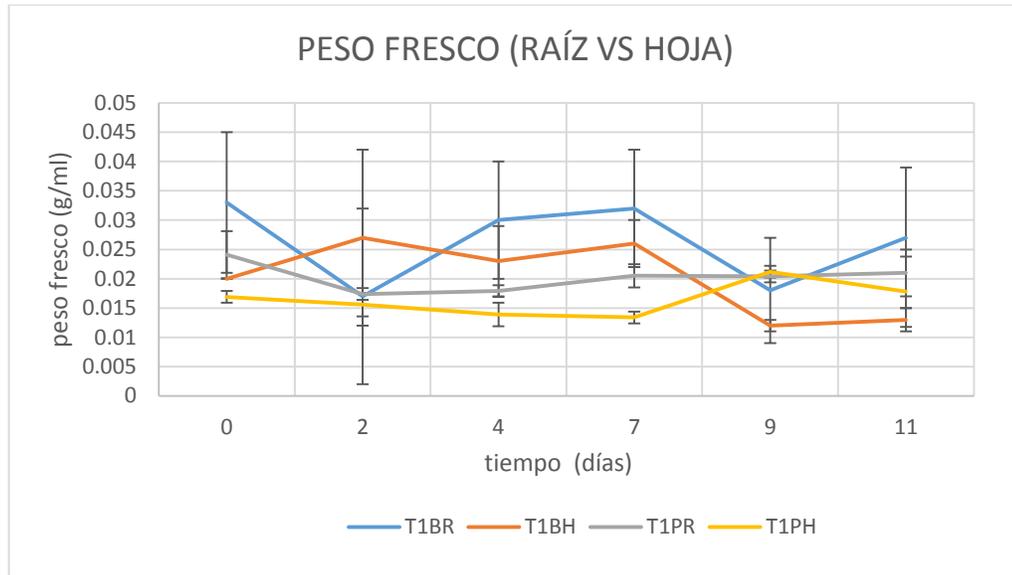


Gráfico 7. Cinética de crecimiento con base al peso fresco comparando los dos explantes de las dos variedades del T1.

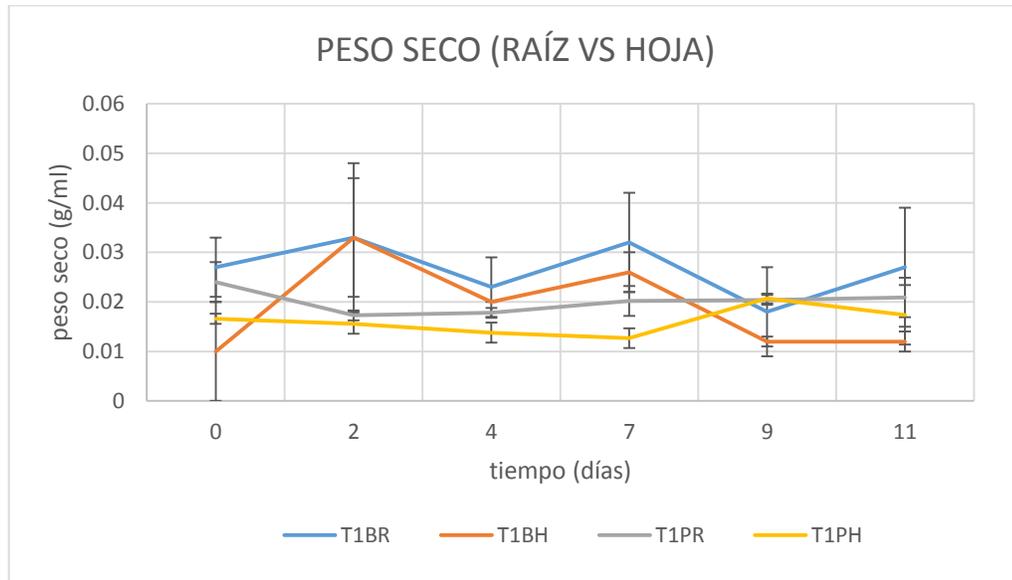


Gráfico 8. Cinética de crecimiento de peso fresco de los dos explantes y las dos variedades del tratamiento T1

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico, MANOVA para comparar las medias a través del tiempo y ver si existen diferencias significativas entre tratamientos y variedades, tomando en consideración la prueba de Wilks Lambda se obtuvo que en los ensayos donde hubo diferencias significativas fue en el Ensayo 1 fueron raíz de peso fresco (PF) y en el ensayo hoja de peso seco (PS). Mientras que en el ensayo 2 no hubo diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros (PF y PS).

Una vez encontrado los ensayos donde hubo diferencias, se contrastaron los diferentes tratamientos para saber en cuáles era donde se presentó una diferencia significativa, considerando la prueba F, se obtuvo que para PF de raíz se encontraron diferencias en el control bayo (CB) en contraste con el tratamiento 1 de la misma variedad (T1B), sí como en el control pinto (CP) en contraste con el T1B, y por último entre tratamiento 1 pinto (T1P) y T1B. Para hoja PS estas diferencias se encontraron entre el CB y CP, así como entre el CB y T1P (Tabla 9)

Tabla 9. Contrastes entre los tratamientos del ensayo 1 de Raíz PF y Hoja PS.

| ENSAYO | CONTRASTES | | | | |
|-------------------------|------------|----------|-------|-------|---------|
| Ensayo 1 Raíz PF | Valor | F exacta | No DF | Den F | Pob > F |
| CB*T1B | 26.77808 | 21.4225 | 5 | 4 | 0.0055* |
| CP*T1B | 16.438708 | 13.1510 | 5 | 4 | 0.0136* |
| T1P*T1B | 21.196482 | 16.9572 | 5 | 4 | 0.0085* |
| Ensayo 1 Hoja PS | | | | | |
| CB*CP | 7.8306478 | 6.2645 | 5 | 4 | 0.0499* |
| CB*T1P | 7.9317790 | 6.3454 | 5 | 4 | 0.0488* |

CB: Control Bayo, CP: Control Pinto, T1B: Tratamiento 1 Bayo, T1P: Tratamiento 1 Pinto,
*Diferencias significativas

Así mismo se hizo el análisis comparando la respuesta entre los dos explantes, para saber si existía diferencia significativa, tomando en cuenta el tratamiento 1 del ensayo 1 (Tabla 10). Obteniendo en peso fresco y peso seco diferencias entre el mismo explante de las dos variedades tanto de hoja como de raíz (BH*PH y BR*PR), al igual que en entre diferentes explantes de las variedades (BH*PR y BR*PH).

Tabla 10. Contrastes entre explantes de las dos variedades con base al tratamiento 1 del ensayo 1.

| ENSAYO | CONTRASTES | | | | |
|--------------------|------------|----------|-------|-------|---------|
| Ensayo 1 PF | Valor | F exacta | No DF | Den F | Pob > F |
| BH*PH | 61.246795 | 48.9974 | 5 | 4 | 0.0011* |
| BR*PR | 28.140615 | 22.5125 | 5 | 4 | 0.0050* |
| BH*PR | 31.405541 | 16.9572 | 5 | 4 | 0.0085* |
| BR*PH | 57.199995 | 45.7600 | 5 | 4 | 0.0013* |
| Ensayo 1 PS | | | | | |
| BH*PH | 21.9567788 | 17.5654 | 5 | 4 | 0.0079* |
| BR*PR | 11.586988 | 9.2696 | 5 | 4 | 0.0255* |
| BH*PR | 9.4131618 | 7.5305 | 5 | 4 | 0.0365* |
| BR*PH | 25.343186 | 20.2745 | 5 | 4 | 0.0061* |

BH: Bayo Hoja, BR: Bayo Raíz, PH: Pinto Hoja, PR: Pinto Raíz

Ensayo 2

En el gráfico 9 se representa el peso fresco de raíz de las dos variedades con base en la metodología empleada del ensayo 2, en este se puede observar que el tratamiento 2 (30% PEG) de la variedad Pinto Saltillo fue el que tuvo una mejor respuesta ya que presentó un mayor peso fresco en comparación con los demás

tratamientos, el que tuvo menor crecimiento fue el tratamiento 1 (20% PEG) de la variedad Bayo Madero, ninguno de los seis tratamientos probados presentó una disminución del peso fresco durante los 11 días evaluados.

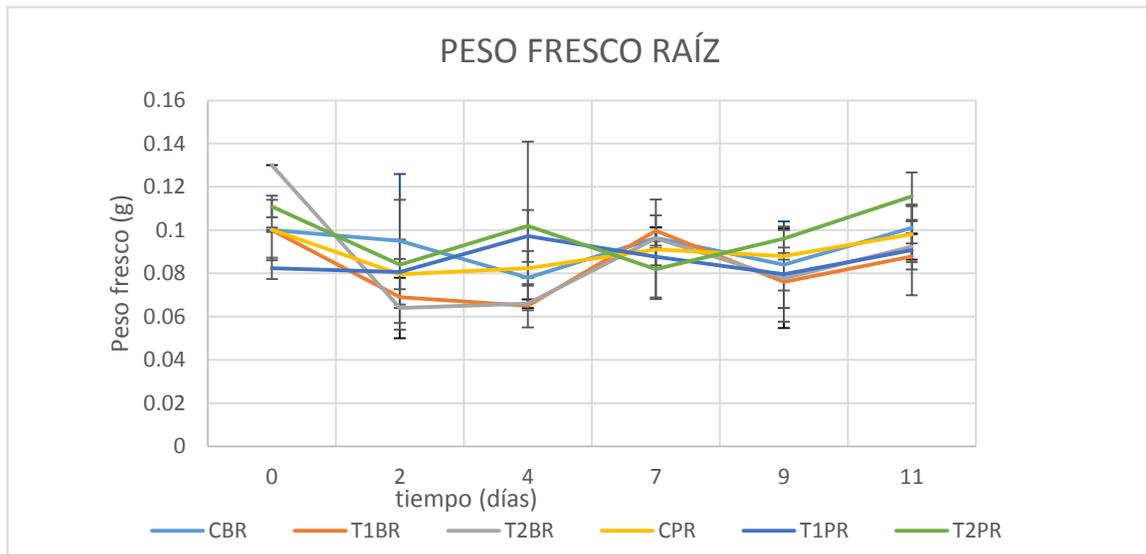


Gráfico 9. Cinética de crecimiento con base al peso fresco de raíz del ensayo 2.

En el gráfico 10 se observa el crecimiento con base al peso seco de raíz de las dos variedades, al igual que en el peso fresco el tratamiento que obtuvo una mejor respuesta fue el tratamiento 2 de la variedad Pinto Saltillo y el que presentó un menor peso seco fue el tratamiento 1 de la variedad Bayo Madero, el peso del control de la variedad Pinto se mantuvo constante durante 9 días incluso en el día 11 presentó un aumento del peso, para el tratamiento 1 y 2 de la variedad Bayo presentaron una disminución del peso al segundo día el cual se mantuvo hasta el día 4 y este aumento para el día 7 para mantenerse hasta el día 11.

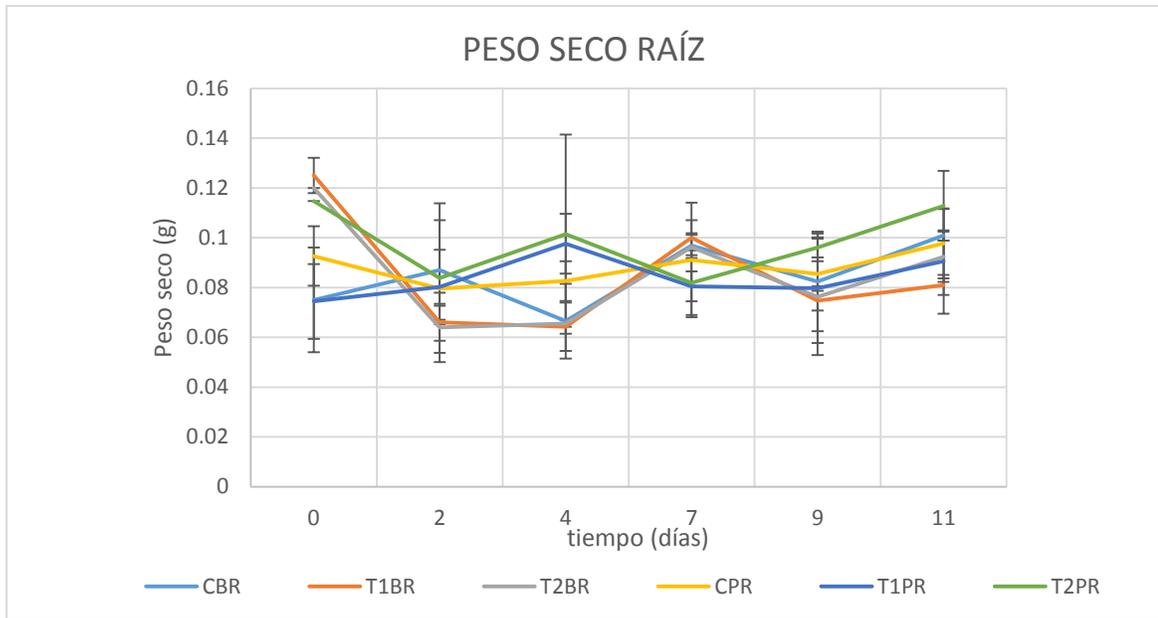


Gráfico 10. Cinética de crecimiento con base al peso seco de raíz del ensayo 2.

Para caracterizar mejor a las variedades utilizadas de *Phaseolus vulgaris*, se calculó el índice de crecimiento en ambos ensayos (Tabla 11.)

Tabla 11. Índices de crecimiento calculados para las dos variedades en el ensayo 1 de hoja y raíz y del ensayo 2 de raíz

| CULTIVOS CELULARES | ÍNDICE DE CRECIMIENTO | |
|-----------------------|-----------------------|----------|
| | ENSAYO 1 | ENSAYO 2 |
| BMR | 0.823 | 0.291 |
| BMH | 0.118 | 0.055 |
| PSR | 0.148 | |
| PSH | 0.241 | |

BMR: Bayo Madero raíz, BMH: Bayo Madero hoja, PSR: Pinto Saltillo raíz, PSH: Pinto Saltillo hoja

6.4.2 Conteo y viabilidad celular

Ensayo 1

En el gráfico 11 se observa el número total de células de raíz para las dos variedades del ensayo 1, el control de la variedad Bayo Madero fue el que tuvo un mayor número de células en comparación con los demás tratamientos, el mayor crecimiento de éste se observó en el día 7 para después presentar una disminución hasta el día 11. El tratamiento 1 (20% PEG) de la variedad Bayo presentó el menor número de células, mientras que la variedad Pinto Saltillo tuvo mejor respuesta en el tratamiento 1, sin embargo pero no se observó demasiada diferencia en comparación con el control.

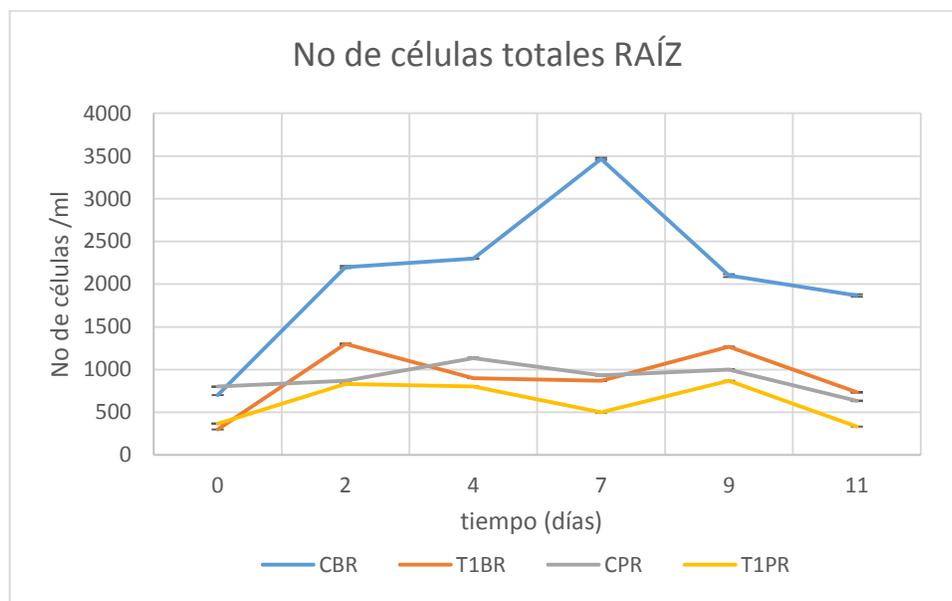


Grafico 11. Número total de células de raíz del ensayo 1

El número total de células para el explante de hoja de las dos variedades se presenta en el gráfico 12, en el cual se observa que el control de la variedad Pinto Saltillo tuvo mejor respuesta mientras que el que tuvo un mayor número de células fue el tratamiento 1 de la variedad Bayo Madero, así mismo el control de

esta variedad se mantuvo constante durante los 11 días al igual que el tratamiento 1 de Pinto donde no se presentó una disminución de este parámetro.

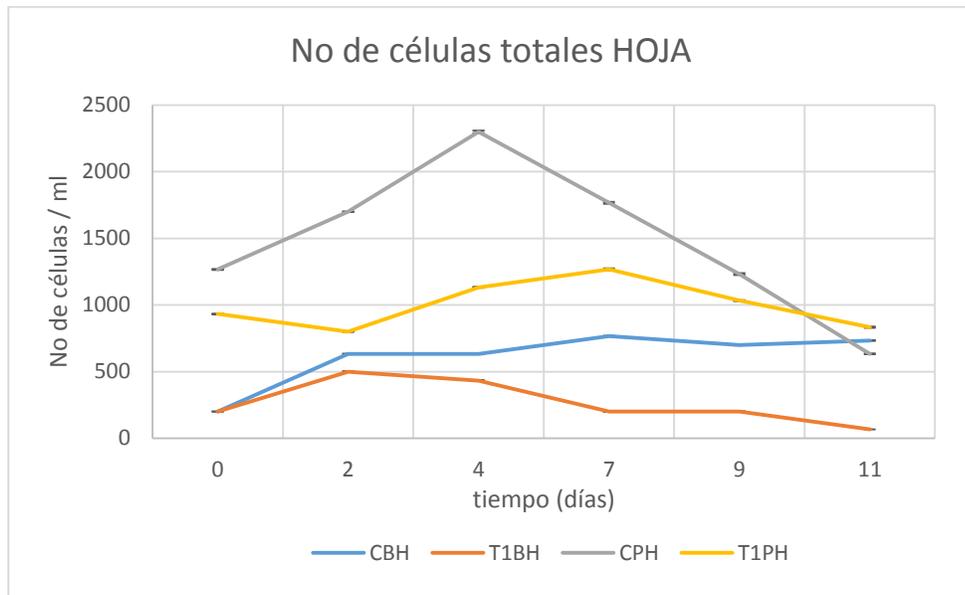


Gráfico 12. Número total de células de hoja del ensayo 1.

En el gráfico 13 se graficó el número total de células de los dos explantes de las dos variedades del tratamiento 1. El explante de hoja de la variedad de Pinto Saltillo tuvo un mayor número de células en comparación con Bayo Madero, mientras que para raíz pasó lo contrario, Bayo Madero tuvo mayor número de células que Pinto Saltillo.

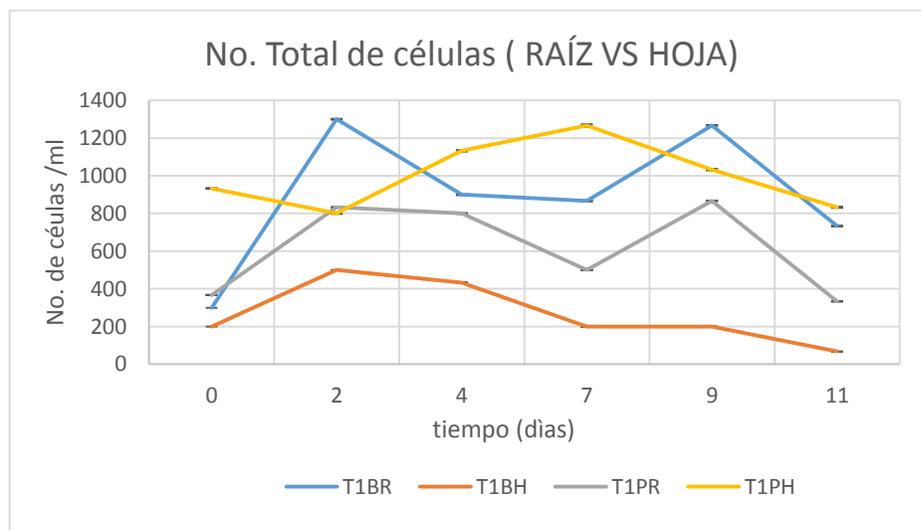


Gráfico 13. Número total de células comparando los dos explantes de las dos variedades en base al T1.

También se evaluó la viabilidad celular en base al porcentaje de células muertas. En el gráfico 14 se representa la viabilidad de las células provenientes del explante de raíz de las dos variedades, observando que la variedad Pinto Saltillo fue la que presentó una mayor porcentaje de células muertas de hasta un 60% en los dos tratamientos, mientras que la variedad Bayo Madero el mayor porcentaje de células muertas que tuvo fue de 32 % en el tratamiento 1 hasta el día 11.

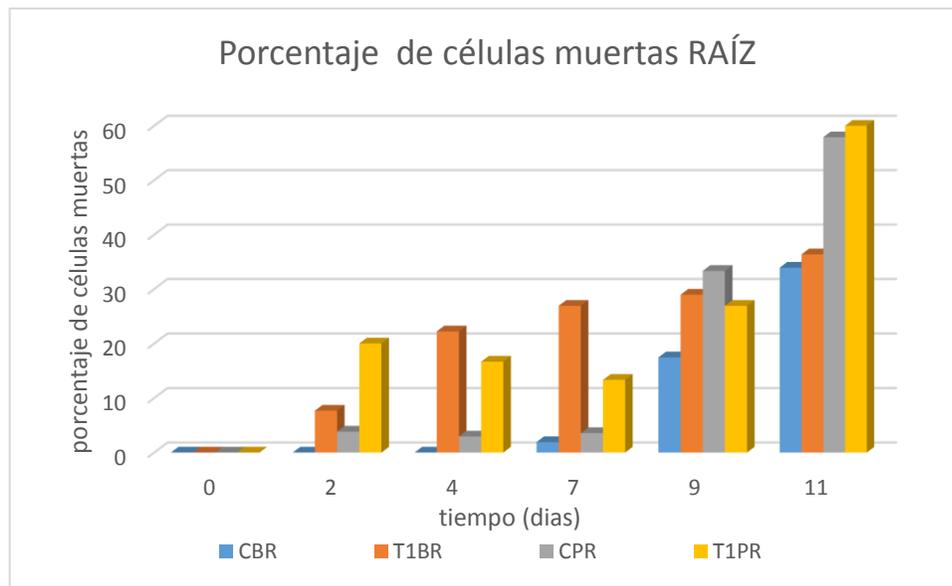


Gráfico 14. Porcentaje de células muertas de raíz del ensayo 1.

En cuanto al explante de hoja, el porcentaje de células muertas evaluado se presenta en el gráfico 15, en el cual el tratamiento 1 de la variedad Bayo y el control de Pinto tuvieron un 100 % de células muertas para el día once. El tratamiento 1 de Pinto tuvo un máximo porcentaje de células muertas del 32% y el control de Bayo de un 36%.

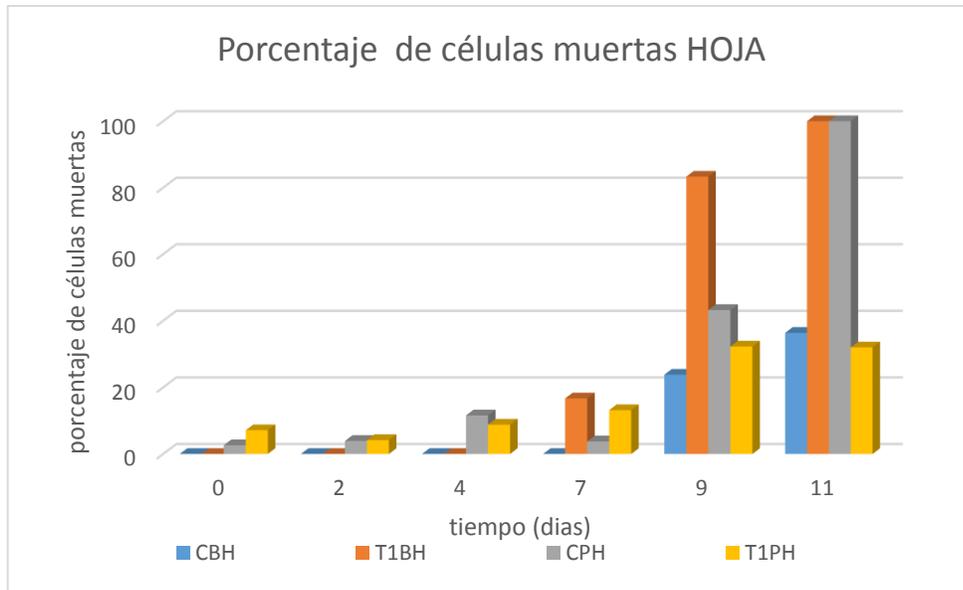


Gráfico 15. Porcentaje de células muertas de hoja del ensayo 1.

Análisis estadístico.

Al igual que en los parámetros de peso fresco y peso seco, se realizó un análisis estadístico, MANOVA para comparar las medias a través del tiempo y ver si hay diferencias significativas entre tratamientos y variedades en cuanto al número total de células, tomando en consideración la prueba de Wilks Lamda. Obteniendo diferencias significativas en el ensayo 1 de los dos explantes (raíz y hoja), el ensayo 2 para raíz no mostró diferencia significativa.

Una vez identificados los ensayos donde hubo diferencias, se hizo el análisis para saber en que combinaciones se encontraban estas diferencias considerando la prueba F, obteniendo que en el ensayo 1 de raíz se encontraron entre el CB y CP, así como entre CB y T1P, en el caso de hoja se encontraron estas diferencias entre el CB y CP al igual que entre el CP y T1P (Tabla 11). También se hizo una comparación entre explantes del ensayo 1 del tratamiento 1 encontrando diferencias en Bayo Madero entre la raíz y la hoja (BH* BR), así como en el explante de raíz entre las dos variedades (BR*PR) y por último entre el explante de raíz de Bayo y hoja de Pinto (BR*PH).

Tabla 12. Contrastes con base al número de células totales en el ensayo 1 de ambos explantes y entre explantes.

| ENSAYO | CONTRASTES | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------|------------|----------|----------|-------|---------|
| Ensayo 1 Raíz No. Total de células | Valor | F exacta | No DF | Den F | Pob > F |
| CB*CP | 19.6106 | 15.6885 | 5 | 4 | 0.0098* |
| CB*T1P | 10.947561 | 8.7580 | 5 | 4 | 0.0281* |
| Ensayo 1 Hoja No. Total de células | | | | | |
| CB*CP | 16.446647 | 13.1573 | 5 | 4 | 0.0136* |
| CP*T1P | 24.482399 | 21.9859 | 5 | 4 | 0.0052* |
| Ensayo 1 No. Total de células comparando el T1. | | | | | |
| BH*BR | 40.964722 | 32.7718 | 5 | 4 | 0.0024* |
| BR*PR | 22.778446 | 18.2228 | 5 | 4 | 0.0074* |
| BR*PH | 37.905276 | 30.3242 | 5 | 4 | 0.0028* |

Ensayo 2

En el gráfico 16 se presenta el número total de células de raíz del ensayo 2, en éste se puede observar que en los dos controles de las dos variedades se presentó el mayor número de células, encontrándose en la variedad Pinto el número máximo en el día 7, tanto el tratamiento 1 y 2 de esta variedad presentó un número de células constantes incluso en ningún día se presentó una disminución en las células, observando que el tratamiento 2 registró un aumento en el día 11. En ambos tratamientos de la variedad Bayo se presentó un menor

número de células en comparación con la otra variedad, teniendo el tratamiento 2 el menor número de células de todos los tratamientos de las dos variedades.

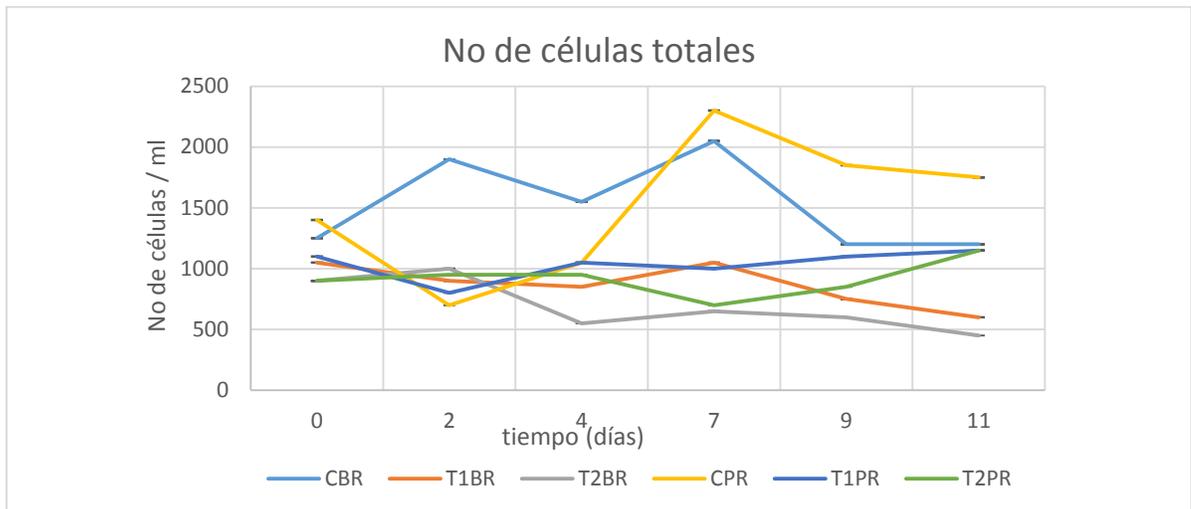


Gráfico 16. Número total de celulas de raíz del ensayo 2.

En porcentaje de células muertas para raíz de las dos variedades, se representa en el gráfico 17, donde se puede observar que el tratamiento 2 de la variedad Bayo Madero presentó el mayor porcentaje de células muertas con un 44% en el día 11, mientras que el control de Pinto sólo obtuvo un 17 % para el mismo día.

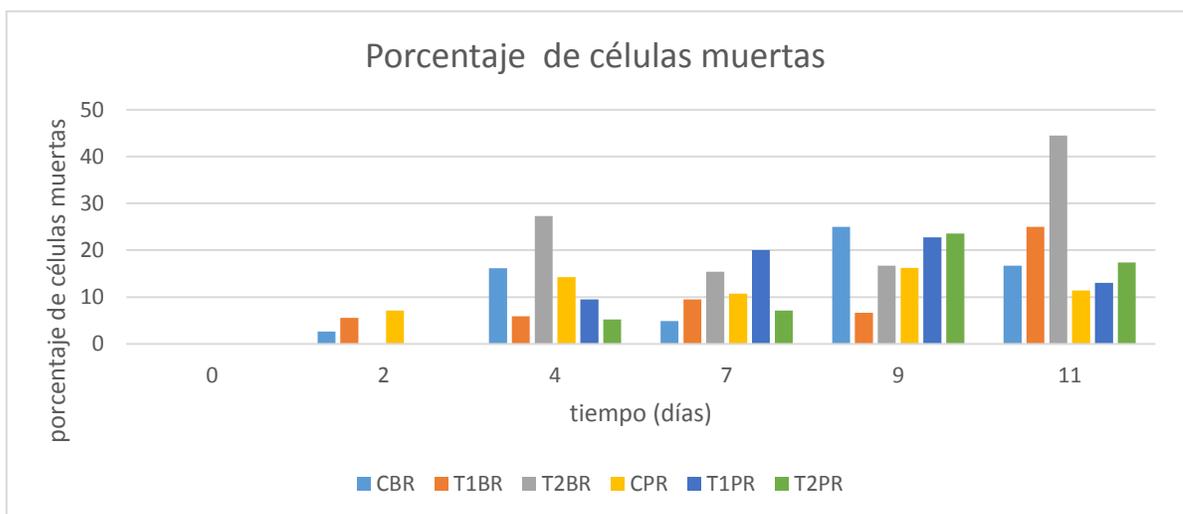


Gráfico 17. Porcentaje de células muertas de raíz del ensayo 2.

VII. Discusión y análisis de resultados

7.1 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos

La finalidad de esta etapa fue obtener plántulas asépticas, es decir, libre de agentes contaminantes así como lograr el mayor porcentaje de germinación para a partir de estas plántulas obtener los explantes de hoja y raíz para su posterior inducción de callo y así obtener el material con el cual se pudo caracterizar los cultivos celulares. Los dos métodos de desinfección probados no presentaron problemas de contaminación debido al uso de agentes desinfectantes, antibióticos, fungicidas y bactericidas, los cuales cumplen funciones específicas y con ellos lograr la asepsia necesaria y obtener plántulas sanas. Los contaminantes más frecuentes en el cultivo *in vitro* son bacterias y hongos filamentosos (Alvarado, 1988), muchos de éstos no generan daños a las plantas de campo, sin embargo se convierten en patógenos en condiciones *in vitro*.

Meré y Vázquez (2003) al igual que George y Sherrington (1984), mencionan que la imbibición en etanol como antiséptico elimina el aire y disuelve la capa epicuticular de las semillas, ejerciendo un efecto en la permeabilidad desorganizando la estructura lipídica de la membrana y desnaturalizando proteínas, logrando así la inactivación de muchos microorganismos, pero esto no logra la eliminación en su totalidad de estos contaminantes es por ello que se hace el uso de otros agentes desinfectantes.

El hipoclorito de sodio (NaClO_2 al 15 % v/v) actúa como agente oxidante inactivando proteínas enzimáticas y desnaturalizando proteínas, afectando a bacterias, esporas, hongos y virus, en el cloro se adicionó una solución de plata coloidal (Mycrodin), la cual reacciona con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inactiva a las enzimas del metabolismo del oxígeno (Rehabil, 2004) inhibiendo así la respiración de las bacterias presentes en las superficies de las semillas y con ello logrando la muerte de las mismas. También se adicionó Tween 20, éste actúa como agente surfactante, disminuyendo la tensión superficial, permitiendo la penetración de las sustancias desinfectantes, eliminando las ceras de las plantas (George y Sherrington, 1984, Pierki, 1990 y Uribe, 1998).

Para lograr la aspesia total algunos autores como Geroge y Sheerington (1984) recomiendan la utilización de desinfectantes útiles en la eliminación de patógenos, elaborados a base de bactericidas como es el caso del Agrymicin-500 el cual está compuesto por antibióticos como sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre monohidratado, para así eliminar bacterias. Así mismo se empleó el uso de un fungicida Benomil, el cual inhibe el ensamble de microtubulos y su despolimerización (Soto-Arredondo, 2011), también inhibe la progresión del ciclo celular a mitosis e induce la muerte por apoptosis de los hongos.

Muchos microorganismos están asociados a los tejidos de las plantas, algunos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos; generalmente no se eliminan con procesos de desinfección superficial ya que se requiere de la adición de uno o más antibióticos, ya sea en el proceso de desinfección o en los medios de cultivo. En este trabajo se utilizaron dos antibióticos para eliminar cualquier posible contaminación durante el proceso de germinación. Se utilizó Cefotaxime el cual es antibiótico perteneciente al grupo de las cefalosporinas, inhibe la síntesis de peptidoglicanos, unidad estructural esencial de la formación de la pared bacteriana (Perera, Rodríguez Gil, 2001). La nistatina es un fungicida poliénico el cual actúa contra hongos, la unión del fungicida con los esteroides (ergosterol) de membrana genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas, también puede causar daños en las vías de la respiración celular (Manuel Cuencas-Estrella, 2010).

Con la finalidad de acelerar el proceso de germinación se adicionó ácido giberélico en la solución de remojo junto con los antibióticos durante 24 horas, con el remojo se estimuló la germinación gracias a la imbibición del agua por las semillas a, hinchándose y posteriormente dando lugar a la germinación y emergencia de la plántula. El AG₃ tiene varias funciones, induce la germinación de semillas en condiciones de dormancia (Peng & Harberd, 2002), así mismo estimula la división y elongación celular entre otras funciones.

En el método 2 de desinfección se obtuvieron mejores resultados en cuanto al porcentaje de germinación. Debido a que las semillas requieren de una serie de condiciones específicas para poder lograr el proceso de germinación. Algunas de estas condiciones son externas a la semilla, es decir aquellas que debe reunir el ambiente que las rodea por ejemplo; la disponibilidad de agua, las temperaturas adecuadas así como la presencia o ausencia de luz, también están las condiciones internas de la semillas, es decir las que debe reunir la propia semilla para poder germinar como lo son: la viabilidad, la madurez (madurez fisiológica, lista para germinar) y la permeabilidad al agua y al oxígeno de la semillas .

La baja respuesta a la germinación se asocia a fenómenos de dormancia seminal (Upadhyaya, y Nigam,-S.N., 1999) relacionados con: (i) la presencia de una cubierta (testa o endocarpo) lignificada, que actúa como una barrera mecánica en la salida del embrión o en el intercambio hídrico y gaseoso (López-Granados y García-Torres, 1996; Barnett, 1997; Cardina y Sparrow, 1997; Bandyopadhyay y al., 1999) (ii) equilibrios hormonales en el endospermo no favorables para el desarrollo del embrión (Pinfield y Gwarazimba, 1992; Jinks,-R.L. and Ciccarese,-L., 1997; Benech-Arnold,-R.L.; et al., 1999) y (iii) desfases entre el proceso de maduración del fruto y del embrión (Cheplick 1992). Existen diferentes tipos de dormancia en las cuales se encuentra la dormancia por impermeabilidad, en donde las cubiertas seminales más externas son impermeables al agua, al oxígeno o a ambas, las semillas germinarán hasta que estas cubiertas se ablanden por efecto del agua u hongos o se rompan por alteración del frío y calor. Las cubiertas impermeables se presentan en las leguminosas familia a la que pertenece *Phaseolus vulgaris*. Estos fenómenos pudieron afectar la germinación de la semilla.

También el bajo porcentaje de germinación se puede relacionar a los tiempos y concentraciones de los agentes desinfectantes propios de los métodos que se emplearon. Para ello se debe considerar el hecho de que cualquier agente químico que mate microorganismos también causan daño al tejido vegetal, por lo que la principal limitante en este punto es encontrar un sistema que mate la mayor cantidad de microorganismos causando el menor daño posible a las células vegetales

(Introducción al cultivo de tejidos vegetales, 1999). En el método 1 donde no hubo germinación de semillas, se tuvieron mayores tiempos de exposición a los agentes químicos, una mayor concentración de AG_3 así como la adición PPM (Plant Preservative Mixture) el cual actúa como biocida de amplio espectro que elimina las bacterias y las células de los hongos, previene la germinación de esporas y, en concentraciones más altas, puede eliminar la contaminación endógena de los explantes, los ingredientes activos del PPM penetran el hongo o la pared de la bacteria e inhiben la actividad de las enzimas clave dentro de los ciclos metabólicos centrales como lo son el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, también puede inhibir el transporte de monosacáridos y aminoácidos desde el medio hacia las células de hongos o bacterias. El PPM no afecta la germinación *in vitro* de semillas si se usa en las concentraciones recomendadas por el fabricante (0.05-1%), este factor fue el que pudo haber afectado la germinación en el método 1 ya que la concentración que se utilizó fue de 1%.

Un porcentaje bajo o nulo de contaminación no asegura, un alto porcentaje de germinación dentro del cultivo *in vitro*, lo que se busca es una relación favorable entre en agente desinfectante en tiempo y concentración y la semilla, para así poder favorecer la germinación ya que la mayoría de los componentes empleados en los métodos de desinfección dañan los tejidos vegetales. El método ideal es aquel que es capaz de destruir la mayor cantidad de agentes contaminantes obteniendo un alto porcentaje de germinación, este se puede lograr con la realización de diferentes ensayos. Para fines de este trabajo con las plántulas que lograron germinar se pudieron obtener los explantes y la cantidad necesaria para poder inducirlos a callo.

7.2 Inducción y proliferación de callos

Para que una célula diferenciada exprese su totipotencialidad es necesario que primero experimente una desdiferenciación y a continuación una nueva diferenciación que la capacita para responder a ciertos estímulos de cultivo o ambientales (Bhojwani *et al.*, 1986). El callo es una masa amorfa de células no

diferenciadas surgida de la proliferación de células del parénquima, frecuentemente es el resultado de una herida generada en cualquier órgano de la planta como raíz, hoja o tallo, generalmente se generan en centros de células que presentan una actividad meristemáticas. Algunos callos son nodulares, los cuales están fuertemente lignificados y son duros en su textura lo que no les permite separarse fácilmente, también hay callos frágiles que se pueden separar fácilmente y a los cuales se les denomina callos friables. Los callos obtenidos en este trabajo fueron callos friables en ambas variedades en los explantes. Algunos callos presentaron una pigmentación localizada en todo el callo o algunas regiones.

El crecimiento celular es un proceso controlado por los reguladores de crecimiento, los cuales juegan un papel importante, no solo dentro de las plantas como universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Esaú, 1985). Los reguladores de crecimiento son sustancias orgánicas transmisoras de signos (químicos, luz, etc.) que son percibidos por receptores químicos con función reguladora (homeostasis) modulando una respuesta determinada. La influencia de las auxinas en la formación de callo podría estar relacionado con la capacidad que tienen estos compuestos de estimular la división de las células e influir indirectamente en la regulación del ciclo celular, estimulando notablemente la expresión de ciclinas a nivel transcripcional, por ejemplo, las del tipo D, desencadenando la activación de cinasas necesarias para la etapa G1 del ciclo celular (Arellano et al., 2008). En la etapa G1, periodo en el que las células crecen y acumulan nutrientes, se reporta que las auxinas y las citocininas inducen la acumulación de ciclinas y por tanto promueven un nuevo ciclo celular (Smith y Atkins 2002; Jurado,2010). La inducción de callo se evidenció inicialmente en las zonas donde se hicieron los cortes de las hojas y raíz, esto se pudo deber a que los tejidos vegetales tienen tendencia a formar callo a partir de las heridas como una reacción defensiva natural (George, 2008).

El éxito de que los explantes de hoja y raíz que formaran callo se debió al uso de auxinas como el 2-4 D, ANA y AIB las cuales en condiciones *in vitro* promueven una mayor división celular en las zonas del corte del explante, además de que inducen el alargamiento celular, el 2-4 D es la auxina de mayor uso en el cultivo de tejidos

vegetales para la inducción de callo. El uso de citocininas promueve la división y alargamiento celular (en tejidos no meristemáticos), regulan el ciclo celular, retardan la senescencia y también promueven la formación y maduración de cloroplastos, en este caso se usó el BA como citocinina. Probablemente, la respuesta a la formación de callos se presentó por el efecto sinérgico de la presencia de reguladores endógenos en las condiciones físicas del cultivo, que promovieron modificaciones del metabolismo celular y por consiguiente se indujo la respuesta morfogénica de división en las células (Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2007; George, 2008).

La variabilidad genética entre y dentro de los cultivos se refleja primero en la morfología de los callos y posteriormente en los cultivos en suspensión o sistemas de cultivos con los que se trabaje. Algunos autores (Wareing y Al Chalabi 1985, Petiard y Bariaud 1985) opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*, también puede ser causadas por alteraciones o cambios de factores epigenéticos originados por la forma en que se establecen los cultivos. Hay estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Petiard y Bariaud, 1985) como fue el caso de los cultivos de las dos variedades donde se formaron callos con diferentes características morfológicas entre los órganos. Pero aún más, callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos (Lindsey y Yeoman 1983, Bohm, 1982, Cala y Ríos 1999), en este caso los explantes de las mismas variedades no presentaron diferencias en cuanto a su morfología.

También se utilizaron otros compuestos para la inducción y proliferación de callos, los cuales cumplen funciones específicas dentro del medio para así poder obtener mejores resultados, como lo fue el caso de la glicina el cual es un aminoácido que interviene en la síntesis de porfirinas, pilares estructurales de la clorofila y los citocromos, siendo el principal aminoácido con función quelante, favoreciendo la

división celular y la formación de nuevos brotes. Los antioxidantes se usaron para evitar la oxidación, esta se presenta en explantes con altos contenidos de polifenoles, esto puede traer el oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En la tabla 3 se describen a detalle las funciones de los macronutrientes y micronutrientes que componen el medio. La proliferación de callos se logró con el subcultivo a medio nuevo, lo cual permite a las células obtener de nuevo los nutrientes necesarios para seguir dividiéndose y así poder obtener una mayor cantidad de callo.

El callo de la variedad Bayo Madero se decidió mantener en el medio FC-C, ya que callo viejo y el callo nuevo que provenía de los explantes obtenidos de las plántulas que lograron germinar con el método de desinfección 2, tuvieron buena respuesta a este medio y lograron proliferar de manera exitosa. Para la variedad Pinto Saltillo se escogió el medio FC-1 ya que lo que se buscaba era una mayor proliferación, debido a que el callo viejo que se tenía de esta variedad tuvo que ser desechado, por que presentaba mucha oxidación y por lo tanto no se contaba con la cantidad necesaria para inducir a células en suspensión. El medio FC-1 contaba con dos auxinas ANA Y AIB las cuales tienen la función de promover la división, alargamiento y crecimiento celular, debido a la adición de estas auxinas se logró proliferar y tener una cantidad suficiente para la posterior caracterización de las células, además de que ya no se presentó oxidación. Los callos obtenidos a partir de las dos variedades y de los dos explantes fueron friables, es decir, fácilmente disgregables, lo cual era lo deseado para inducir las células en suspensión.

7.3 Caracterización de las líneas celulares

7.3.1 Peso fresco y peso seco

Ensayo 1

El estrés hídrico o sequía de la plantas se puede definir como aquel estrés que es generado debido a que la tasa de transpiración excede a la absorción de agua, en la naturaleza las plantas pueden presentar un déficit hídrico debido a: bajas precipitaciones, baja capacidad de retención del agua del suelo, excesiva salinidad,

temperaturas excesivas (altas o bajas), baja presión de vapor atmosférica entre otros. Estas condiciones capaces de inducir una disminución del agua disponible del citoplasma de las células, también se conoce como estrés osmótico (Levit, 1980). Este tipo de estrés induce en las plantas respuestas que afectan su morfología, fisiología y metabolismo. Cuando el déficit hídrico se presenta lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potters et al, 2007; Shao et al, 2008), este efecto se puede ver en los gráficos 3 y 4 donde la variedad Bayo Madero mantuvo el crecimiento de la de las células provenientes de raíz aún cuando se sometió a estrés y siendo una variedad susceptible a sequía en comparación con el control y la variedad resistente Pinto Saltillo la cual a pesar de no tener un gran aumento en biomasa en los dos parametros (PF y PS), siempre se mantuvo constante su crecimiento aún en condiciones de estrés, esto significa que esta variedad se mantuvo en fase estacionaria, en la cual el crecimiento se mantiene constante, no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células. En los controles se puede observar el crecimiento de las suspensiones celulares el cual por lo general comprende tres fases y su desarrollo es de tipo exponencial, en este caso se presentaron dos ciclos de crecimiento donde hay una fase exponencial pero nunca lograron una fase estacionaria.

Durante el estrés hídrico una de las estructuras de la planta que más daño recibe son las hojas, las cuales son estructuras fotosintéticas que requieren de agua y CO₂ para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Dentro de los efectos fisiológicos que se presentan se observa que las células de las hojas disminuyen su crecimiento, se reduce la expansión y el área foliar (Robles,A.A.C, 2007) , aumento de cera en la cubierta de las hojas, hay cambios en la transpiración. Uno de los mecanismos que más emplean las hojas para evitar la pérdida de agua es el cierre estomático, el cual puede afectar en la reducción de entrada del CO₂, repercutiendo en la fotosíntesis, y por tanto, en la síntesis eficiente de fuentes de carbono para la nutrición vegetal. Durante la sequía se activan genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis del ácido abscísico (ABA), al incrementarse la concentración de esta

hormona se activa una señal que permite amplificar otras cascadas de señalización que regulan el balance hídrico en la planta. El ABA regula el cierre de estomas, esta hormona se incrementa en las hojas debido a la descompartmentalización y redistribución desde los cloroplastos de las células del mesófilo y a la síntesis y transporte desde las raíces, siendo liberado al apoplasto por llegar a las células guarda a través de la transpiración (Zhang y Outlaw, 2001). El ABA produce una pérdida de iones K^+ , Cl^- o malato en las células guarda provocando la salida del agua del citoplasma, dando lugar al cierre de estomas (Roelfsma y Hedrich, 2002), en los cuales ocurre la transpiración, mecanismo por el cual se da la mayor pérdida de agua en las plantas, este proceso ocurre cuando los estomas están turgentes y la presión sobre la pared las hace separarse una de otra, dejando un orificio entre ellas; a través de éste escapa el vapor de agua.

El efecto de la disminución del crecimiento de los cultivos celulares provenientes de la hoja debido a la falta de agua puede observarse en los gráficos 5 y 6 en donde se observa que la variedad susceptible a sequía Bayo Madero al ser sometido a condiciones de déficit de agua disminuyó su biomasa pero ésta a su vez es mayor que el control de la misma variedad, debido tal vez como una primera respuesta y más que crecimiento fue introducir agua y evitó la pérdida de la misma, y así poder continuar con su crecimiento. En tanto la variedad resistente Pinto Saltillo mostró un crecimiento constante a lo largo del ciclo en los dos tratamientos siendo mayor con el control, muchas de las plantas que toleran la deficiencia de agua activan diferentes mecanismos para evitar la pérdida de ésta y tener un mayor aprovechamiento de la misma, existen diferentes mecanismos entre ellos está el ajuste osmótico el cual consiste en una disminución del potencial hídrico en los tejidos, lo cual tiene como consecuencia la entrada del agua y por lo tanto no hay una disminución en la turgencia. La planta en busca de la homeostásis, almacena sustancias que no son constituyentes normales de la célula, un ejemplo de ello es la biosíntesis de osmolitos de bajo peso molecular como: polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de los mismos, así como acumulación de iones como el K^+ la cual ocurre en las vacuolas y en el citoplasma, esto con la finalidad de mantener un potencial de turgencia alto. Pinto Saltillo ha demostrado repetidamente su capacidad de

producción, en condiciones reducidas de lluvia, en comparación con a las variedades tradicionales de este cultivo (INIFAP, 2001). Pinto Villa es otra variedad de frijol del estado de Durango que presenta resistencia a sequía, en la cual se ha observado que en sequía terminal presenta poca disminución de la producción con respecto a otras variedades e incluso con respecto a algunas variedades resistentes (Acosta y Whiste, 1997, Rosales et al., 2000). Se propone que uno de los mecanismos utilizados por esta variedad para sobrevivir a la sequía y mantener su productividad consiste en transportar carbohidratos más eficientemente hacia la vaina, mecanismo que podría compartir con otras variedades como Pinto Saltillo. Se ha propuesto que en frijol, la removilización de foto- asimilados podrían estar involucrados en la resistencia (Covarrubias R., 2011)

Así mismo se compararon los dos explantes de las dos variedades sometidos a una condición de estrés hídrico, observando que tanto en peso fresco como en peso seco (gráficas 7 y 8) tienen el mismo comportamiento, teniendo que la raíz de Bayo Madero fue el que más incrementó su crecimiento, mientras que para la misma variedad las células de hoja fueron las que no respondieron al tratamiento, disminuyendo así su biomasa, esto debido a que como se mencionó anteriormente la hoja es un órgano de la planta del cual su crecimiento depende directamente de la cantidad de agua que se suministra a la misma y la cual es necesaria para cumplir sus funciones vitales. Barrios et al (1998), han demostrado que el frijol común duplica el número de raíces secundarias y terciarias en respuesta a la sequía, así mismo un profundo y extenso sistema radicular respalda el incremento de la productividad de las leguminosas bajo estas condiciones, esto podría explicar por que la raíz aún sometida a este estrés puede continuar con su crecimiento mientras que la hoja lo disminuye en una variedad susceptible. En tanto que para la variedad resistente se pudo observar que ésta no presentó un gran incremento de biomasa, pero tanto en raíz como en hoja éstas mantuvieron su crecimiento constante sin presentar una fase de desaceleración o muerte a lo largo de la evaluación, incluso las células de hoja de Pinto Saltillo presentaron mayor biomasa que la de Bayo Madero.

Estas condiciones de estrés se lograron gracias a la adición de un agente estresante como el PEG el cual permite mantener el medio experimental a valores predeterminados de potencial hídrico y es capaz de competir con las células por el agua debido a su alto peso molecular. Esto facilita la retención del líquido y provoca descensos en el potencial osmótico de manera similar a lo que ocurre cuando se seca el sustrato en el que se cultivan las plantas (Rai et al, 2011). El PEG es una molécula polar y debido a esta propiedad es capaz de formar puentes de hidrógeno con el agua, lo cual permite que al adicionar este agente se una con el agua de manera que no permite que ésta llegue a las células, ocasionando una situación de estrés hídrico para las mismas.

En el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas para peso fresco de raíz y no en peso seco, para este caso se puede observar que en la variedad Bayo Madero hay diferencias entre el control y el tratamiento 1 como se presentan en la gráfica 3 las células sometidas a estrés continuaron creciendo. También se encontró diferencia entre variedades sometidas a estrés esto es coherente ya que como se planteó desde un principio se estudió una variedad resistente y una susceptible y aunque la que no es resistente tuvo un mayor crecimiento, Pinto Saltillo no mostró una disminución en el mismo, posiblemente este crecimiento podría aumentar si se hubiera alargado el tiempo de evaluación. Así mismo la raíz es un órgano que no se ve afectado drásticamente por la sequía, al contrario éste mantiene su velocidad de crecimiento, de igual manera el material que se ocupó para inducir las células en suspensión fue callo, el cual puede presentar variabilidad entre y dentro de los cultivos el cual se ve reflejado primero en la morfología de los callos y posteriormente en los cultivos en suspensión o sistemas de cultivo con los que se trabaja. Algunos autores (Wareing y Al Chalabi 1985, Petiard y Bariaud 1985) opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*. Así, hay estudios donde se observa que los callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Petiard y Bariaud 1985, Holden et al., 1988), éste fue el caso de la *Phaseolus vulgaris*, que dentro de la misma especie, los callos de las dos variedades son diferentes, y el callo de Bayo Madero es más

prolífero que el de Pinto Saltillo, lo cual puede verse reflejado en el crecimiento de las células partiendo de un mismo explante. En el caso de hoja se encontraron diferencias con base al peso seco, teniendo una diferencia entre los controles de las dos variedades, esto debido a la variabilidad que presentaron los callos, ya que de igual manera que en raíz, el callo de hoja de Bayo Madero resultó más prolífero que de Pinto Saltillo.

Cuando se analizó si había diferencias entre explantes de las dos variedades sometidos a estrés, se encontró que en todos los casos hay diferencias, entre variedades de un mismo explante (hoja y raíz), teniendo en cuenta también que los callos de cada variedad se proliferaron en diferentes medios, así las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aún cuando estos provengan de una misma planta y todavía más, de un mismo explante. Las diferencias entre los explantes de las variedades se debe a la habilidad que tienen éstas para resistir la sequía, Pinto Saltillo es una variedad mejorada para resistir ciertas enfermedades, al igual que Bayo Madero, pero la diferencia radica en que Pinto ha presentado características que le permiten desarrollarse aún en condiciones de falta de agua. Los procesos de respuesta al déficit hídrico son iniciados dentro de las plantas que sufren estrés hídrico u osmótico, para ajustar su metabolismo celular y evitar daños causados por la pérdida o deficiencia de agua. Takahasi et al (2000) plantearon la hipótesis de que el estímulo del estrés hídrico es percibido por osmosensores y que posteriormente la señal es transferida al núcleo, lo que provoca un cambio en la expresión de genes por una vía compleja de transducción de señales, como es el aumento de segundos mensajeros. La modificación de la expresión génica está relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción, etc., como respuesta al estrés. En el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se han hecho estudios para saber cuáles son las rutas que siguen las plantas para tolerar el estrés ocasionado por sequía, utilizando al frijol común como modelo biológico, han propuesto que en esta especie la removilización de foto-asimilados podrían estar involucrados en la

resistencia y que para generar cultivos resistentes, será necesario considerar los mecanismos por los cuales la planta distribuye y/o metaboliza su carbono en estas condiciones.

Normalmente el crecimiento celular vegetal da origen a una curva sigmoidea, y presenta 4 fases, sin embargo, en este estudio no se observó esta tendencia, debido a que el método de células en suspensión presenta variantes. Las suspensiones celulares están constituidas principalmente por células meristemáticas indiferenciadas, se distribuyen de manera homogénea a través del medio de cultivo y por estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma, este tipo de cultivo permite el control de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto, sin embargo pueden verse modificadas algunas características de las células presentes en las plantas como su diferenciación y la comunicación intercelular. Las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados de forma natural ya que al dividirse no se separan adecuadamente, por lo cual pueden presentar un estrés nutricional, especialmente de oxígeno, que es causado por la limitación a la transferencia de masa en los agregados, existen variaciones en las condiciones de iluminación con respecto a las células de la periferia, estos agregados se observaron en los cultivos generados de las dos variedades, y como se mencionó en la metodología de estos cultivos fue de donde se tomaron las muestras, lo cual pudo afectar las desviaciones de los resultados.

En las curvas elaboradas a partir de la determinación de peso fresco y peso seco se observó una etapa inicial de 2 a 4 días. Este comportamiento coincide con lo reportado en la literatura durante la fase lag, ya que las células se encuentran en un proceso de adaptación a las nuevas condiciones nutricionales del medio, para luego incrementar la velocidad de división celular durante la fase exponencial (Shig et al., 1996). La etapa exponencial se caracterizó por un incremento de biomasa, como indicador de una mayor concentración celular a consecuencia de la división activa de las células. En las curvas de crecimiento de Bayo Madero la fase estacionaria del cultivo fue muy corta o casi inexistente, probablemente debido a que, al alcanzar el número máximo de células, se produce una rápida lisis y muerte de las células a

consecuencia del consumo de nutrientes en el medio de cultivo (Caballero y Cardona, 2007), así como a la adición de PEG la cual afecta el desarrollo de las células que no tienen una resistencia a sequía, como es el caso de esta variedad. Mientras que la variedad resistente Pinto Saltillo no muestra en ninguno de los casos una fase de muerte, no es el que mayor biomasa obtuvo pero su crecimiento fue constante.

Ensayo 2.

En muchas circunstancias la sensibilidad de las raíces al estrés limita la productividad de las plantas (Stepuhn, H. y Raney J, 2005, Labate, S. et al, 2007). La planta necesita un sistema radical con una arquitectura (densidad, tamaño y proliferación) que respondan a la demanda de agua de los órganos aéreos (Lakshmi, P.; Satish, K.; Tran, L. y Nguyen, H., 2009). En el cultivo del tomate, se ha detectado que una elongación rápida y temprana de las raíces es un indicador importante de resistencia al estrés (Foolad M.R. 2007).

En el gráfico 9 se pudo observar que los tratamientos de la variedad Pinto Saltillo tienen un comportamiento parecido, iniciando su fase exponencial entre el día 2 (T1 y T2) y el día 4 (control), los primeros decaen su crecimiento para el día 4 y para el día 7 comienzan de nuevo una fase exponencial manteniéndose así hasta el día 11 teniendo mejor respuesta el T2, mientras que el control mantuvo un crecimiento constante quedando entre los dos tratamientos, esto debido a que la raíz es un órgano clave para la adaptación a sequía, y esta variedad resulta ser tolerante. La acumulación de solutos durante el estrés hídrico conlleva a un reajuste osmótico en las células de la planta con la única finalidad de incrementar la retención de agua, este puede ser un mecanismo que explique por qué aún sometidas a estrés éstas pueden continuar creciendo. En el caso particular del frijol el desarrollo de las raíces profundas es una característica para mejorar la adaptación a sequía (Beebe et al., 2010; Polanía et al., 2009; White et al., 1994; Sponchiado et al., 1989).

Para la variedad Bayo Madero, en el gráfico 9 se tiene que el control es el que tuvo mejor repuesta, los tratamientos sometidos a estrés presentaron una disminución del crecimiento en el día 2 , esto debido a que se estaban adaptando a las nuevas condiciones que el medio les proporcionaba, para el día 4 lograron su fase exponencial pero no alcanzaron una fase estacionaria entrando a un fase de muerte inmediatamente ya que el PEG no permitía la entrada del agua, y estas pudieron entrar a un proceso de lisis. Las células que lograron sobrevivir comenzaron de nuevo su división y de nuevo entraron a una fase exponencial en donde la tasa específica de crecimiento es constante y medible. Khan et al. (2010) y Bruce et al., (2002) consideran que los desbalances que ocasionan el estrés por sequía en las plantas pueden ser compensados por el mayor crecimiento radicular con un alto uso de foto-asimilados y una mayor absorción de agua.

White y Castillo (1992 y 1989) exponen que en frijol común las diferencias en rendimiento están determinadas por el sistema de raíces y que una mayor capacidad para profundizar raíces en el suelo puede proveer a un genotipo una mejor adaptación a condiciones de estrés hídrico. Sponchiado et al (1989) encontraron que grandes producciones de raíces se asocian a mayor tolerancia a sequía en frijol, sugiriendo una evasión a la sequía debido al incremento de la extracción del agua del suelo. Este hecho que proponen los autores, se pudo observar en las plantas que lograron germinar *in vitro* ya que la variedad Pinto que es resistente tuvo mayor cantidad de raíces tanto primarias como secundarias lo cual podría explicar porque es capaz de responder mejor a las condiciones de estrés hídrico, sin embargo las variedad Bayo presentó una menor cantidad de raíces secundarias, las raíces primarias presentaron mayor grosor incluso se podía observar una nodulación la cual sirve como simbiosis con las bacterias principalmente para la ayudar en la fijación del nitrógeno.

Según lo reportado por Caballero y Cardona (2007), bajas densidades de inóculo o grandes cantidades de nutrientes pueden prolongar la fase lag exponencial, y se espera que estas etapas sean más cortas al emplear un inóculo inicial mayor, estas condiciones se vieron reflejadas en este estudio ya que en el ensayo 1 las cantidades

del inóculo fueron mayores que en el ensayo 2, y en el primero ensayo se pueden observar las fases de la curva de crecimiento hasta la muerte, mientras que en el segundo ensayo se pudo ver que a menor inóculo el ciclo celular puede tardar más en desarrollarse e incluso presentarse dos ciclos y no se observó la fase de muerte. Así mismo en el ensayo 2 al tenerse sistemas aislados, es decir un matraz para cada repetición y cada día las variaciones pueden disminuirse, la agitación es más homogénea en todas las células presentes en el cultivo, disminuyendo así los gradientes de concentración y temperatura, se evita la sedimentación de las mismas y se controla el tamaño de los agregados. Estos factores podrían repercutir en el crecimiento de las células generando otro tipo de estrés. Otro factor que se controla mejor en la segunda metodología, es la aireación del cultivo celular, la cual se encarga de suplementar el oxígeno que favorece el crecimiento celular. Si se decide emplear un protocolo de investigación para estudiar el comportamiento de las células bajo condiciones de estrés, el ensayo 2 resultó ser la mejor metodología para controlar mejor los factores que interfieren en el cultivo de células en suspensión.

7.3.2 Conteo y viabilidad celular

Ensayo 1

Para evaluar el crecimiento de las células vegetales se pueden emplear diversos métodos, uno de ellos es el conteo de células. En este estudio se encontró que la variedad Bayo fue la que tuvo un mayor número de células de raíz, este disminuyó al someterse a una situación de estrés hídrico, el crecimiento radicular está determinado por factores genéticos y del medio, desde el punto de vista físico este depende en gran medida del agua. El potencial de presión o turgor en el interior de las células, proporciona la fuerza necesaria para la elongación celular, en el crecimiento radicular, como en cualquier otro proceso fisiológico que depende de la elongación celular, el agua tiene una participación fundamental al proporcionar la fuerza que produce la expansión, si la entrada de esta molécula a la célula es limitada muy difícilmente ésta podrá dividirse. Algunos autores han encontrado una disminución en la tasa del crecimiento radicular a medida que se desarrolla un déficit

hídrico en la planta (Gingrich, y Russell, 1957); otros autores señalan el aumento en el crecimiento con un déficit hídrico (Vega J.D. 1972), en este caso el crecimiento celular decreció al someterse a estrés. Para la variedad Pinto Saltillo se encontró que a pesar de ser una variedad resistente su crecimiento no se vio incrementado, esto se explica debido a la versatilidad que existe entre estas dos variedades, ya que el éxito y establecimiento de cultivos de callos y posteriormente a células en suspensión, son función de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre, y esta variedad presentó una menor proliferación en el callo lo cual pudo repercutir en el número de células que se desarrollaron. Esta situación se vio reflejada en el análisis estadístico donde se encontró diferencia significativa entre las variedades lo cual se relaciona directamente con la naturaleza de Bayo Madero que tiene la capacidad de generar más callo y a su vez un mayor número de células.

En cuanto al explante de hoja, el control de Pinto tuvo en mayor número de células, mientras que el menor número se presentó en el tratamiento 1 de la variedad susceptible. En solución acuosa ocurren la mayor parte de las reacciones metabólicas, además de procesos necesarios como el crecimiento celular, la fotosíntesis y por lo tanto la productividad (Taiz y Zeiger, 2006) es por ello que el agua se convierte en el principal disolvente biológico, forma parte de las estructuras de las macromoléculas que conforman a las plantas, realiza el transporte de nutrientes, metabolitos en toda la planta así como la excreción de sustancias de desecho. El agua es la forma en la cual el hidrógeno es absorbido y posteriormente asimilado durante la fotosíntesis, en las vacuolas ejerce presión sobre el protoplasma y la pared, manteniendo así la turgencia en hojas, raíces y otros órganos y por consiguiente evitar la plasmólisis de la célula. Por todo lo mencionado anteriormente si se limita la entrada de agua a las células adicionando agentes estresantes como fue el caso del PEG, éstas no serán capaces de realizar todas sus funciones metabólicas y la célula puede morir, como se observa en el gráfico 11 donde los tratamientos donde se sometió a estrés disminuyeron su número de células. En el análisis estadístico se encontraron diferencias entre los controles de las variedades teniendo una mayor número de células en Pinto, característica que puede estar relacionado con que las células de esta variedad pudieran tener un mayor capacidad

para dividirse o pueden hacerlo en menos tiempo, y Bayo necesita más tiempo para que las células proliferen ya que como se observa en el gráfico 11, las células de Bayo son menores pero estas en ningún momento cesan de su crecimiento caso contrario con Pinto donde se puede ver que esta llega a una fase de muerte y el número de células disminuye.

Cuando se compararon los explantes sometidos a déficit hídrico, las células de hoja de bayo fueron las que se vieron más afectadas, debido a que cuando la disponibilidad de agua es baja hay una pérdida en la turgencia de las mismas y esto propicia que el protoplasto se contraiga hasta que la membrana se separe de la pared provocando la muerte celular, también disminuye el alargamiento celular, hay un cierre de estomas y disminución de la fotosíntesis. Si las células no cuenta con mecanismos de defensa frente a estos factores que dañen la integridad de estas serán más propensas a sufrir daños, algunas plantas toman ciertas estrategias adaptativas como la fijación del carbono que se relaciona con la transpiración. Adoptan estas estrategias debido a que las plantas deben mantener sus estomas abiertos a expensas de la pérdida de agua para acceder al CO₂ ambiental, éstas han modificado en patrón tradicional de carbono para conservar el agua y ser más eficientes, mecanismo que Pinto Saltillo pudo haber adoptado para mantener la sobrevivencia de las células de hoja, aunque aún se deben realizar más estudios que puedan indicar cuál es la vía que sigue esta variedad. Otro mecanismo que contribuye a la resistencia a la sequía es el ajuste osmótico, al cual Turner y Jones (1980) definen como la habilidad de las plantas para acumular solutos activamente ante un déficit hídrico. Este mecanismo permite mantener un potencial de turgencia alto, a pesar del descenso en el potencial hídrico, lo que puede traer como consecuencia que la apertura del estoma, la expansión foliar y la fotosíntesis se mantengan por más tiempo (Lakso, 1979). En especies como frijol y manzano se ha encontrado que la baja transpiración y la alta resistencia estomática a la difusión se deben al cierre estomático inducido por el déficit de agua en el suelo que es frecuentemente asociado con una acumulación de ácido abscísico (Lakso, 1979; Ludlow y Muchow, 1990; Webb y Mansfield, 1992), éste podría ser un parámetro que se cuantifique en las variedades estudiadas, para saber si Pinto Saltillo pudiera

seguir este mecanismo para que las células de hojas sigan creciendo. En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los explantes de Bayo teniendo un mayor número el explante de raíz que el de hoja, esto debido a que como mencionan varios artículos en una situación de estrés a sequía la raíz puede mantener su velocidad de crecimiento mientras que la parte aérea en este caso las hojas la disminuye (IBT), también hubo diferencias entre las variedades del explante de raíz, teniendo mayor cantidad la variedad de Bayo esto a que como se mencionó con anterioridad está relacionado con la naturaleza de la variedad.

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó la tinción con azul de Evans, un colorante no permeable con baja toxicidad para las células; esta técnica se ha empleado para determinar el número relativo de células muertas en cultivos de células en suspensión, esto mediante la cuenta de células muertas que se tiñen de manera selectiva con el azul y las células vivas que no presentan esta coloración (Song et al., 1999). Al teñir las células con azul de Evans se puede observar la integridad de la membrana, es decir que no permite la entrada del colorante y por consiguiente se observan sin teñir , por lo que son células viables (Herrera y Rodríguez, 2008) , mientras que cuando esta se ve dañada la célula logra teñirse con este colorante, es por ello que el conteo se realizó a las células que lograron presentar esta coloración azul, teniendo para raíz el mayor porcentaje de células muertas en la variedad Pinto Saltillo en los dos tratamientos, lo cual coincide con el número de células ya que para el día 11 se presenta una etapa de muerte celular y esto se ve reflejado en que hubo un mayor número de células teñidas el mismo día. Como se mencionó anteriormente el éxito del cultivo depende del explante utilizado, el callo de raíz de esta variedad resulto ser menos prolífero, incluso conforme avanza su crecimiento este tiende a oxidarse. En la etapa de muerte en las suspensiones celulares se presenta a menudo por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como consecuencia del metabolismo celular (Trejo- Tapia et al., 2007). Los ROS provocan estrés oxidativo en las células y activan las enzimas, oxidasas. En algunos casos, las células liberan fenoles al medio de cultivo y estos provocan un efecto tóxico que evita la proliferación y si no son retirados del medio causan la

muerte celular (Ogita, 2005; Azofeifa, 2009), lo cual pudo provocar que esta variedad tuviera un mayor porcentaje de células muertas.

En el explante de hoja se observó que el mayor porcentaje de células muertas se presentó en la variedad Pinto Saltillo y en el tratamiento 1 de Bayo Madero. Cuando la célula se ve afectada por un estrés de sequía, la turgencia dentro de ésta disminuye provocando efectos como la plasmólisis el cual es un proceso de contracción o retracción de protoplasma de la célula debido a la pérdida de agua en esa célula, se produce cuando la concentración del medio exterior contiene un mayor número de moléculas disueltas y menos agua por unidad de volumen en comparación con el líquido celular, entonces la membrana semipermeable deja fluir libremente moléculas de agua aumentando el flujo hacia el exterior, por lo que la concentración de la vacuola debe igualar la concentración del medio externo disminuyendo el volumen vacuolar debido a la pérdida de agua. La membrana celular se reduce y se separa de la pared celular debido a que la célula se plasmoliza. Si la célula no consigue agua para llenar de nuevo la vacuola para que la célula recupere su turgencia, lo más probable es que ésta muera, hecho por el cual al ser una variedad susceptible Bayo Madero las células de hoja al ser privadas de agua se plasmolizaron y murieron permitiendo así la entrada del azul de Evans y observándose teñidas estas células muertas.

Ensayo 2

El polietilenglicol (PEG), se ha utilizado para simular el estrés por sequía en la plantas (G.E Janes, 1996; M.T Parman y R.P. Moore 1968). La adición del PEG al medio de cultivo simula el estrés hídrico al actuar como un agente osmótico no penetrante que reduce el potencial hídrico donde del medio en el que crecen las células. Por lo tanto en las células resistentes al estrés hídrico se pueden seleccionar de la población mediante el uso de PEG como agente estresante, tal y como se observa en el gráfico 16 las células de Raíz de Pinto que fueron sometidas a estrés hídrico tuvieron mejor respuesta que las de Bayo, incluso las de Pinto siguieron su crecimiento hasta el último día de evaluación, mientras que bayo comenzó a

descender su número de células a partir del día 7 esto por ser una variedad susceptible a este tipo de estrés. Cuando se impide el paso del agua a las células, éstas comienzan a sufrir cambios en su morfología y metabolismo debido a que el agua es capaz de disolver biomoléculas sustancias iónicas, polares y también las que no tienen carga, también se encarga del transporte de nutrientes necesarios para la célula, al no tener este disolvente puede haber una acumulación de solutos y la interacción del agua con los solutos disueltos tienen un efecto negativo sobre el potencial hídrico ya que disminuye la cantidad de agua disponible en el sistema, así que la poca cantidad de agua que logre entrar a las células no será suficiente para llevar a cabo todas las funciones vitales de la célula, llegando a provocar su muerte si no cuenta con un sistema eficiente de tolerancia a la falta de agua.

En la universidad de Chapingo y el IBT se han dedicado a estudiar los posibles mecanismos que siguen aquellas plantas con resistencia a sequía a nivel molecular, en el IBT se plantea que la resistencia a la sequía es el resultado de la activación y represión de varios genes. La clasificación de los genes que responden a la sequía dependen de su función, donde podemos encontrar aquellos que codifican para proteínas que ayudan a la tolerancia al estrés, genes que codifican para proteínas que pueden proteger macromoléculas y membranas, en este grupo se encuentran las proteínas LEA las cuales han sido de gran estudio ya que se acumulan en etapas tardías del desarrollo de muchas plantas, también se acumulan en partes vegetativas como una respuesta al estrés osmótico y a la aplicación del ABA, lo que hace pensar que tienen un papel importante en la protección de las estructuras celulares durante el déficit hídrico, también pueden tener una función esencial en la adaptación de las semillas a deshidratación extrema (Carles et al., 2002), en la Universidad de Chapingo se encontraron 54 LEAS en plantas de las cuales 4 se presentaron en frijol, dentro de la clasificación se encuentran también proteasas, genes antioxidantes y proteínas que participan en la detoxificación de enzimas.

Últimamente se ha mostrado interés en las acuaporinas las cuales son canales de agua que pueden facilitar el paso del agua a través de las membranas biológicas, pertenecen a la familia del grupo mayor de proteínas integrales (MIP), presentes en

todo los reinos (Maurel, 1997), éstas se acumulan en plantas expuestas a ambientes secos, pueden jugar un papel muy importante en el ajuste osmótico celular, se han encontrado en 60 especies vegetales, en donde la alfalfa, especie perteneciente al grupo de las leguminosas, cuenta con 4 de estas proteínas. La Galactinol sintetasa se ha observado que se acumula durante la maduración de las semillas de Arabidopsis, frijol y maíz, otra enzima estudiada ha sido la colina monoxigenasa (CMO) la cual cataliza un paso en el sistema de la biosíntesis de la glicina-betaina soluto que se acumula en plantas en respuesta a salinidad y sequía, una de las vías de mayor interés es la de glicina-betaina el cual es un osmoprotector que se acumula durante la floración, los niveles de mRNA de la colina monoxigenasa y la actividad enzimática se incrementa de 3 a 5 veces en plantas bajo estrés hídrico. La síntesis de la glicina-betaina se da por medio de una vía de oxidación de la colina por dos pasos, el primer paso es catalizado por la CMO, la cual produce la forma hidratada de la betaina-aldehído y el segundo es mediado por la betaina-aldehído deshidrogenasa. Hay un gran interés en encontrar diferentes vías que provean a los cultivos resistencia a cierto tipo de estrés, la resistencia a sequia es una vía de la cual aún no se tiene mucha información para saber cómo actúan las plantas frente a este estrés, pero se generalizan diferentes mecanismos de respuesta, en el IBT se han enfocado en estudiar estas vías utilizando como modelo al frijol, y con el fin de ayudar a este estudio es que decidieron caracterizarse estas dos variedades de frijol común.

VIII. CONCLUSIONES

- La desinfección de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) se logró en presencia de alcohol etílico al 70% durante 1 min, hipoclorito de sodio al 15 % más 3ml/ 250ml de una solución coloidal de plata y tween 20 en una concentración de 0.5 ml/250 ml durante 12 min, como bactericida se usó Agrimicin a una concentración de 4 g/l y como fungicida se utilizó Benomil a la misma concentración durante 10 min, se dejaron en una solución estéril de AG₃ con antibióticos, cefotaxime 1ml/l y nistatina 50 mg/l durante 24 h. Después del tiempo de reposo las semillas se sembraron en el medio de cultivo MS (FG-1) complementado con antibióticos, cefotaxime 1ml/l y nistatina 50 mg/l, logrando un 50% de germinación en Bayo Madero y un 10% en Pinto Saltillo.
- La inducción de callo de hoja y raíz de Bayo Madero se logró de manera exitosa en el medio FC-C y para Pinto Saltillo en el medio FC-1.
- La variedad Bayo Madero en ambos explantes presentó una mayor proliferación de callos que Pinto Saltillo los callos presentaron un aspecto compacto, firme y friable, una coloración amarillo- verde para raíz y en el caso de hoja, un color blanco- café para Bayo mientras que los callos de Pinto de ambos explantes, tuvieron una morfología firme, fácilmente disgregable e hidratados de una coloración amarillo-café.
- El establecimiento de los cultivos celulares de las dos variedades y los dos explantes se realizó de manera exitosa en el medio FCC.
- En el ensayo 1 se encontraron diferencias significativas en el peso fresco de raíz y peso seco de hoja , donde se pudo observar que hubo diferencias entre tratamientos y entre variedades. Al comparar los explantes de las dos variedades sometidas a estrés hídrico (T1), se encontraron diferencias entre explantes y entre variedades. En cuanto al número de células hubo diferencias entre tratamientos de una misma variedad y entre los controles de las dos

variedades para los dos explantes, en el caso del porcentaje de células muertas para raíz el que tuvo un mayor porcentaje fue en tratamiento 1 de Pinto y el que tuvo menos fue el control de Bayo. En hoja el tratamiento 1 de Bayo tuvo el mayor porcentaje y el menor se observó en el tratamiento 1 de Pinto.

- En el ensayo 2 no se observaron diferencias significativas en cuanto al peso fresco y peso seco de raíz. Para el número total de células no hubo diferencias significativas, los dos tratamientos de Bayo tienden a disminuir su número de células para el último día de evaluación, mientras que el control de Pinto es el que presentó un mayor número de células. En cuanto a la viabilidad el tratamiento 2 de Bayo fue el que tuvo un mayor porcentaje de células muertas y el control de Pinto presentó el menor porcentaje.

IX. PERSPECTIVAS

- Una vez encontrado el método adecuado para la caracterización, probar concentraciones más altas de PEG.
- En el ensayo 2 probar los dos explantes hoja y raíz.
- Determinar otros parámetros, para corroborar el efecto del PEG, como el contenido de proteína.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Arrijoa Morales, G. (2001). *Cultivo de callo in vitro como una alternativa para evaluar resistencia a salinidad y sequía en frijol Phaseolus vulgaris L.* Universidad Autónoma de Nuevo León (Tesis)
- Azcon-Bieto, J., Talón Edición, M., & Ona, M.-U. (n.d.). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Barcelona, España: McGraw Hill Interamerica.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro . *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175.
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note- Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Handa, A. K. (1981). Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress. *Plant Science Letters*, 21(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(81\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0304-4211(81)90065-1)
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16.
- Carbajal Azcona A, & Gonzales Fernandez M. (2013). Propiedades físicas y químicas del agua. *Agua*, 1–16. Retrieved 9
- Córdoba, U. N. de. (1999). Fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal. Retrieved from http://www.fca.proed.unc.edu.ar/pluginfile.php/17291/mod_resource/content/1/Fitohormonas y Reguladores del Crecimiento.pdf
- Rojas Garcidueñas, M.(2003)La resistencia a la sequia. *Ciencia UANL* Vol. 6 pp.326-331.
- FIRA. (2016). Panorama Agroalimentario | Frijol 2016 0. *Panorama Agroalimentario*, 36.
- Florido, M., Bao, L., Lara, R. M., Castro, Y., & Acosta, R. (2018). Efecto del estrés hídrico simulado con peg 6000 en la germinación en tomate (Solanum sección Lycopersicon) Effect of water stress simulated with PEG 6000 on tomato seed germination (Solanum section Lycopersicon), 39(1), 87–92.
- Garc, M., & Dom, L. (2013). *Morfología de la planta de frijol comun Phaseolus vulgaris L.* CIAT 2ª edición
- García, Á. (2018). La importancia del agua en el mundo. *Ecoticias*, 11. Retrieved from

http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_2.pdf

- García, L. R., Pérez, J. P., Rodríguez, D. T., Montesino, Y. P., & Quintana, R. (2006). Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv . CIAP 7247, 6(2), 73–77.
- García, L. R., Leiva-mora, M., Pérez, A. C., Collado, R., Poveda, I., & Ica, L. (2015). Efecto del estrés hídrico inducido con PEG 6000 sobre la germinación in vitro de semillas de *Phaseolus vulgaris* L . cv . ' ICA Pijao , ' 15(4), 243–249.
- García O., N. C., Trejo C., R., Pedroza S., A., Gómez L., S. F., Esparza M., J. H., & Sepúlveda B., M. (2005). Bases moleculares de la resistencia a sequía en plantas. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*, IV(2), 65–74.
- Handa, S., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (1986). Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress. *Plant Physiology*, 80(4), 938–945.
- Investigacion, C. D. E., Del, R., Francisco, L. I. C., Mayorga, J., Humberto, P., & Valdés, M. (2006). Folleto Técnico Núm. 22 Noviembre 2006.
- Lazaro Ponciano, L., Cultivo *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* para su micropropagacion. Instituto Politecnico Nacional. (Tesis)
- Martinez, J. P. (1999). Efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis cultivares de poroto *Phaseolus vulgaris*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72(1965), 219–235.
- Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico . Una revisión Plant responses to water deficit stress . A review. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179–191.
- Ramos Rodriguez, T.M., Regeneracion de melon (*Cucumis melo* L). bajo condiciones *in vitro* como modelo biologico, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Rivas, E. R., Prospectivos, C. D. E., Evelia, L., & Bernal, P. (2008). Historia , naturaleza y cualidades alimentarias del frijol History , nature and bean ' s nutritious quality Resumen Introducción. *Revista Investigación Científica*, 4(3), 1–21.
- Robles, A. A. C. (2007). Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología*, 14, 253–262.
- Romero, R. (Ing. A. (2010). Relaciones Agua Planta en el Sistema Suelo-Planta-Atmósfera Transporte de Agua, 1–10.
- Rosabal Ayan, L., Martínez González, L., Reyes Guerrero, Y., Dell, J., Rodríguez Miriam Núñez Vázquez, A., Científica, R., ... Rodríguez DraC Miriam Núñez Vázquez, A. (2014). Revisión bibliográfica ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y EXPRESIÓN DE GENES EN CONDICIONES DE DÉFICIT HÍDRICO. INFLUENCIA EN EL PROCESO DE GERMINACIÓN Review Physiological, biochemistry and gene expression aspects in water stress.

- Influence in the germ. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 24–35.
- SAGARPA. (2016). Atlas Agroalimentario 2016, 1–145.
- Szabados, L., Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *Cultivo de Tejidos En La Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*.
- Ulloa, J. A., Petra, M. C., Ulloa, R., Carmen, J., Ramírez, R., Blanca, I. B. Q., & Ulloa, E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 3(8), 5–9.
- Víctor M. Hernández-López¹, Ma. Luisa P. Vargas-Vázquez², J. S. M.-M., & Mayek-Pérez¹, S. H.-D. Y. N. (2013). advances and perspectives origin , domestication and diversification of common beans . advances and perspectives "Revolución Neolítica " que marcó un punto importante en sido determinantes claves en la estructura de la diversidad. *Fitotecnia*, 36(2), 95–104.
- Vignoli, R. (2002). Esterilizacion y desinfeccion. *Temas de Bacteriología y Virología Para CEFA.*, 1–21.
- Villar Hernández, B. de J. (2014). Colegio de postgraduados. *Modelos Bayesianos Para La Distribución de Especies Con Registros de Solo Presencias*, 120.
- W.M. Morgan. (1950). Cultivo de tejido vegetal. *Baltomsborough UK International Plant Laboratories*.
- Williams-linera, G., Hernando, C., Sánchez, Patricia; Lissarrague, José Ramón; Baeza, P., Cancino, J., Morfológicas, E. Y., Propio, D. E. L., ... Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía, U. (2009). Desarrollo, características y aplicaciones de un dendrómetro potenciométrico para la medición continua del crecimiento diametral de especies arbóreas. *Actas Del V Congreso Forestal Español. SECF y _Junta de Castilla y León, Ávila.*, 13(1), 11.

XI. ANEXOS

Tabla 1. Sales del medio de cultivo conocido como MS (Murashigue & Skoog 1962), soluciones de macro y micro elementos, concentradas 100X para preparar.

| Nombre del compuesto | Formula | P.M (g) | Cantidades para 1l (1X) en: | |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------|-----------------------|
| | | | Masa (mg) | Moles (Mm) |
| Compuestos inorgánicos | | | | |
| Micronutrientes | | | | |
| Nitrato de potasio | KNO ₃ | 101.108 | 1900 | 18.791 |
| Nitrato de amonio | NH ₄ NO ₃ | 80.04 | 1650 | 20.614 |
| Cloruro de calcio | CaCl ₂ | 110.99 | 332.08 | 2.993 |
| Sulfato de Magnesio | MgSO ₄ .7H ₂ O | 246.498 | 370 | 1.501 |
| Fosfato de potasio | KH ₂ PO ₄ | 136.09 | 170 | 1.249 |
| Micronutrientes | | | | |
| Sulfato de manganeso | MnSO ₄ .H ₂ O | 169.01 | 16.7 | 0.099 |
| Sulfato de zinc | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 287.54 | 8.6 | 0.0299 |
| Ácido bórico | H ₃ BO ₃ | 61.86 | 6.2 | 0.1002 |
| Yoduro de potasio | KI | 166.01 | 0.83 | 4.99x10 ⁻³ |
| Sulfato de cobre | CuSO ₄ .5H ₂ O | 249.68 | 0.025 | 0.1 µM |
| Molibdato de sodio | Na ₂ Mb ₄ .2H ₂ O | 241.95 | 0.25 | 1.03 µM |
| Cloruro de cobalto | CoCl ₂ .6H ₂ O | 237.93 | 0.025 | 0.105 µM |
| Sulfato ferroso | FeSO ₄ .7H ₂ O | 278.028 | 27.8 | 0.1 |
| Na ₂ EDTA | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na 2.H ₂ O | 336.2 | 33.28 | 0.099 |

Tabla 2. Compuestos orgánicos, concentración de soluciones concentradas de fitohormonas, glicina, adenina y antioxidantes.

| Nombre del compuesto | Abreviatura | Formula | P.M (g) | Concentración (mg) |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------|
| Compuestos orgánicos | | | | Para preparar 100 ml |
| Auxinas | | | | |
| Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético | 2,4-D | C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃ | 221 | 10 |
| Ácido α-Naftalenacético | ANA | C ₁₂ H ₁₀ O ₂ | 186.2 | 10 |
| Ácido indol-3-acético | AIA | C ₁₀ H ₉ NO ₂ | 175.2 | 10 |
| Ácido indol-3-butírico | AIB | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ | 203.2 | 10 |
| Cinetinas | | | | |
| 6-Bencil amino purina | BAP | C ₁₂ H ₁₁ N ₅ | 225.3 | 10 |
| Giberelinas | | | | |
| Ácido giberélico | AG ₃ | C ₁₉ H ₂₂ O ₆ | 346.4 | 10 |
| Otros compuestos orgánicos | | | | |
| Ácido amino acético o aminoetanoico | Glicina | C ₂ H ₅ NO ₂ | 75.07 | 20 |
| Antioxidantes | | | | |
| L-Ácido acético | Vitamina C | C ₆ H ₈ O ₆ | 176.1 | 50 |
| Ácido cítrico | | H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O | 210.146 | 50 |

Tabla 3. Soluciones concentradas (100 X) del coctel de vitaminas conocido como:

| Nombre del compuesto | Formula | P.M (g) | Concentración (mg) |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------|
| Vitamina R2 (MS modificado) | | | Para preparar 1l |
| Myoinositol | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180.2 | 100 |
| Ácido nicotínico | C ₆ H ₁₅ NO ₂ | 123.1 | 1 |
| Piridoxina hidrocloide | C ₈ H ₁₁ NO ₃ . HCl | 205.6 | 1 |
| Tiamina hidrocloide | C ₈ H ₁₇ N ₄ O ₄ .HCl | 337.3 | 2 |

