



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“Establecimiento y caracterización de  
cultivos celulares crecidos bajo  
condiciones de estrés hídrico y  
regeneración de dos variedades de frijol  
(*Phaseolus vulgaris* L.)”

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**  
PRESENTA  
**RAMÍREZ ARÉVALO FABIAN**



CDMX

2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio  
Vocal: Teresa de Jesús Olivera Flores  
Secretario: Carmina Montiel Pacheco  
1er. Suplente: Michelle Monserrath Camacho Lara  
2do. Suplente: Edgar Ricardo Vázquez Martínez

### SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 116 - LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS  
VEGETALES, DEPTO. DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD  
DE QUÍMICA, UNAM.

Asesora:

---

Teresa de Jesús Olivera Flores

Sustentante:

---

Fabian Ramírez Arévalo

## **Agradecimientos**

En primer lugar, gracias a mis padres por ser mi principal soporte en mi formación académica, gracias por siempre mostrarme su apoyo incondicional y brindarme todas las herramientas necesarias para que pudiera continuar siempre con mi educación, gracias por cada consejo que me dieron, por siempre querer lo mejor para mí, por estar conmigo siempre y por todo su amor.

Gracias a la maestra María Teresa de Jesús por su guía, asesoría y enseñanzas durante todo este proyecto, gracias por todo el conocimiento que me brindó y por siempre mantener el interés en ayudarme a concluir esta etapa. También gracias a la doctora Irma Bernal Lugo y al Doctor Elpidio García Ramírez por brindarme su asesoría y me permitieron el uso de sus instalaciones para la realización de esta investigación.

Gracias a todos los maestros de la Facultad de Química y a la Universidad por ser uno de los pilares en mi formación académica, gracias por darme las herramientas necesarias para ser un profesionalista íntegro, ético y con amor por su vocación.

Gracias a mi familia, paterna y materna por, pese a la distancia, mantener y mostrarme siempre su apoyo y cariño durante todos estos años, siempre será mi motivación para salir adelante.

Gracias a Jessica, por todo el cariño y apoyo durante todo este tiempo, por nunca dejar de creer en mí y motivarme siempre a seguir adelante. Gracias a Miriam y Alejandro por siempre mostrarme su cariño y apoyo incondicional

Gracias a todos mis amigos, Mike, Alberto, Fernando, Addi, Tercero, Vicky, Montoya, Genaro, Jazz, por su amistad tan sincera, por su apoyo en esta etapa de nuestras vidas y sobre todo por todas las cosas que vivimos juntos que nos ayudaron a madurar y crecer juntos.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANCEDENTES.....	13
2.1 Generalidades del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	13
2.1.1. Taxonomía del frijol.....	13
2.1.2. Importancia del frijol.....	14
2.1.3. Información nutrimental.....	17
2.1.4. Variedades de frijol.....	19
2.2. Cultivo de tejidos vegetales.....	20
2.2.1 Factores que afectan el crecimiento y morfogénesis.....	21
2.2.1.1. Genotipo.....	21
2.2.1.2. Medios de cultivo.....	21
2.2.1.3. Condiciones de incubación.....	26
2.2.1.4. Factores endógenos de la planta donadora.....	26
2.2.2. Tipos de cultivos.....	27
2.2.2.1 Cultivo de callo.....	27
2.2.2.2. Células en suspensión.....	28
2.2.3. Evaluación del crecimiento.....	28
2.2.3.1. Cinética de crecimiento.....	28
2.2.4. Regeneración.....	30
2.2.5. Estrés en plantas.....	32
2.3. Cultivos <i>in vitro</i> de frijol.....	35
III. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo general.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40

IV. HIPÓTESIS.....	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1 Metodología general. ....	41
5.2 Material biológico. ....	42
5.3 Establecimiento de cultivos <i>ex vitro</i> . ....	42
5.4 Medios de cultivo y condiciones de incubación. ....	43
5.5 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> . ....	43
5.5.1 Método de desinfección. ....	43
5.6 Germinación de semillas <i>in vitro</i> . ....	44
5.7 Inducción y proliferación de callo. ....	44
5.8 Cinética de crecimiento de callo. ....	45
5.9 Células en suspensión. ....	46
5.9.1 Peso fresco y peso seco. ....	46
5.9.2 Determinación de proteína. ....	47
5.9.3 Determinación de turbidez. ....	47
5.9.4 Análisis estadístico. ....	48
5.10 Regeneración. ....	48
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
6.1 Establecimiento de cultivos <i>ex vitro</i> . ....	50
6.2 Germinación <i>in vitro</i> . ....	52
6.3 Inducción y proliferación. ....	54
6.4 Cinética de crecimiento en callo. ....	57
6.5 Evaluación del crecimiento bajo condiciones de estrés osmótico en células en suspensión. ....	60
6.5.1 Peso fresco. ....	61
6.5.2 Peso seco.....	65
6.5.3 Contenido proteínico.....	70
6.5.4 Turbidez.....	74
6.6 Regeneración. ....	82
VII. CONCLUSIONES.....	87

VIII. PERSPECTIVAS.....	89
IX. ANEXOS.....	90
X. BIBLIOGRAFÍA.....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en maduración de fruto.....	13
Figura 2. Taxonomía de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	14
Figura 3. Callo de raíz proveniente de la variedad Bayo Madero.....	27
Figura 4. Curva de crecimiento de células vegetales.....	29
Figura 5. Rutas de regeneración empleadas en cultivo de tejidos vegetales..	31
Figura 6. Tipos de estrés en plantas.....	34
Figura 7. Diagrama de flujo experimental de la metodología general.....	41
Figura 8. Semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	42
Figura 9. Ruta propuesta para la regeneración de embriones inmaduros de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	48
Figura 10. Plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en condiciones de hidroponia...	51
Figura 11. Bayo Madero germinado en condiciones <i>in vitro</i> .....	53
Figura 12. Inducción de callo de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. a partir de dos explantes.....	55
Figura 13. Callo de la variedad Bayo Madero.....	56
Figura 14. Callo de la variedad Pinto Saltillo .....	56
Figura 15. Frascos utilizados para la cinética de crecimiento de callo.....	58
Figura 16. Establecimiento de cultivos madre en células en suspensión.....	61
Figura 17. Plantas regeneradas de la variedad Pinto Saltillo.....	83
Figura 18. Desarrollo del proceso de regeneración para <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de frijol.....	18
Tabla 2. Componentes de los medios de cultivo .....	23
Tabla 3. Revisión bibliográfica de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	36
Tabla 4. Composición de medio MG.....	44
Tabla 5. Composición de medio BM y PS.....	45
Tabla 6. Composición de medios utilizados para la regeneración de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	50
Tabla 7. Germinación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en invernadero.....	51
Tabla 8. Germinación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en condiciones <i>in vitro</i> .....	53
Tabla 9. Inducción de formación de callo de explantes de hoja y raíz.....	55
Tabla 10. Parámetros de crecimiento obtenidos a partir de la cinética de crecimiento de callo.....	59
Tabla 11. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.....	62
Tabla 12. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.....	63
Tabla 13. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.....	64
Tabla 14. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.....	65
Tabla 15. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.....	67
Tabla 16. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.....	68
Tabla 17. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.....	69
Tabla 18. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.....	70

Tabla 19. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.....	71
Tabla 20. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.....	72
Tabla 21. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.....	73
Tabla 22. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.....	74
Tabla 23. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.....	75
Tabla 24. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.....	76
Tabla 25. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.....	77
Tabla 26. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.....	78
Tabla 27. Número de explantes y plantas obtenidos a partir de la regeneración de embriones inmaduros.....	84
Tabla 29. Medio de cultivo conocido como MS.....	90
Tabla 30. Soluciones concentradas (100x) del medio conocido como MS...	91
Tabla 31. Soluciones concentradas (100x) del coctel de vitaminas conocido como R2.....	92

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Producción mundial de frijol en 2017.....	15
Gráfico 2. Rendimiento mundial de frijol en 2017.....	16
Gráfico 3. Cinética de crecimiento de callo.....	57
Gráfico 4. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando raíz como explante para peso fresco.....	62
Gráfico 5. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando hoja como explante para peso fresco.....	63
Gráfico 6. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando raíz como explante para peso fresco.....	64
Gráfico 7. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando hoja como explante para peso fresco.....	65
Gráfico 8. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando raíz como explante para peso seco.....	66
Gráfico 9. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando hoja como explante para peso seco.....	67
Gráfico 10. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando raíz como explante para peso seco.....	68
Gráfico 11. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando hoja como explante para peso seco.....	69
Gráfico 12. Contenido de proteína del explante de raíz para Bayo Madero....	70
Gráfico 13. Contenido de proteína del explante de hoja para Bayo Madero...	71
Gráfico 14. Contenido de proteína del explante de raíz para Pinto Saltillo.....	72
Gráfico 15. Contenido de proteína del explante de hoja para Pinto Saltillo....	73
Gráfico 16. Turbidez en células en suspensión del explante de raíz para Bayo Madero.....	74
Gráfico 17. Turbidez en células en suspensión del explante de hoja para Bayo Madero.....	75
Gráfico 18. Turbidez en células en suspensión del explante de raíz para Pinto Saltillo.....	76

Gráfico 19. Turbidez en células en suspensión del explante de hoja para 77  
Pinto Saltillo.....

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius	<b>IC</b>	Índice de crecimiento	<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	<b>Kg</b>	Kilogramo	<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>ABA</b>	Ácido abscísico	<b>Kcal</b>	Kilocalorías	<b>Psi</b>	Libras por pulgada Cuadrada
<b>AH</b>	Sulfato de adenina	<b>L</b>	Lineo	<b>PVP</b>	Polinilpirrolidona
<b>AIA</b>	Ácido indol-3-acético	<b>L</b>	Litros	<b>Redox</b>	Oxido-reducción
<b>AIB</b>	Ácido indol-3-butírico	<b>LEA</b>	Late Embriogenesis Abundant Proteins	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>AG<sub>3</sub></b>	Ácido giberélico	<b>mg</b>	Miligramos	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>ANA</b>	Ácido 1-naftalenacético	<b>min</b>	Minutos	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>ml</b>	Mililitros	<b>RNAm</b>	RNA mensajero
<b>BA</b>	6-N-Bencilaminopurina	<b>mM</b>	Milimolar	<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>CAM</b>	metabolismo ácido de las crasuláceas	<b>mm</b>	Milímetros	<b>SOD</b>	Super óxido dismutasa
<b>cm</b>	Centímetros	<b>MS</b>	Murashige y Skoog	<b>TDZ</b>	Tidiazuron
<b>dds</b>	Días después de la siembra	<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótico	<b>td</b>	Tiempo de duplicación Celular
<b>DNA</b>	ácido desoxiribonucleico	<b>ng</b>	Nanogramos	<b>Tris</b>	Tris(hidroxiometil) Aminometano
<b>g</b>	Gramos	<b>nm</b>	Nanómetros	<b>μ</b>	Velocidad específica de crecimiento
<b>h</b>	Horas	<b>P</b>	<i>Phaseolus</i>	<b>μl</b>	Microlitros
<b>ha</b>	Hectárea	<b>PEG</b>	Polietilenglicol		

## RESUMEN

El frijol es uno de los alimentos básicos en el consumo diario de los mexicanos. Al ser un alimento clave en la economía y en la dieta de este país, resulta necesario realizar investigaciones para mejorar la producción del mismo.

Esta leguminosa se cultiva en condiciones de temporal, lo cual reduce el tiempo en el que puede ser cultivada, lo que repercute en su producción. Además, se ve afectado por la sequía y, en consecuencia, por el cambio climático. Debido a esto, y gracias a herramientas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales, es posible contar con programas de mejoramiento genético a corto plazo de esta especie.

En el presente trabajo se analizaron dos variedades de frijol, Bayo Madero (susceptible a la sequía) y Pinto Saltillo (resistente a la sequía). Para cada especie se determinaron las condiciones óptimas de geminación, tanto *in vitro* como *ex vitro*. A partir de las plántulas geminadas, se buscó la inducción de callo a partir de dos explantes, hoja y raíz.

Cuando se logró la inducción del callo, se realizaron cinéticas de crecimiento para evaluar su comportamiento y determinar las fases de crecimiento. Con esta información, se realizaron ensayos de células en suspensión, en él cuál se agregó un agente osmótico, PEG (8000), para simular las condiciones de sequía. Se utilizaron concentraciones de 0%, 3% y 6% para evaluar la respuesta de cada explante y se determinó el Peso fresco, Peso seco, Turbidez y Contenido proteínico.

Por último, a partir de los embriones inmaduros obtenidos de las plantas *ex vitro*, se realizó un ensayo de regeneración probando dos medios diferentes y dos explantes, cotiledón y eje embrionario. Con el cual se logró la regeneración de las dos especies a partir de los cotiledones.

## I. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene un rol muy diverso e importante en los sistemas de producción agrícola y en la dieta de una gran parte de la población en muchas regiones del mundo. Esta leguminosa representa un componente significativo del consumo en los países en desarrollo y, en términos nutricionales, complementa a los cereales como fuente de proteínas y minerales (Gaucín y Torres 2012).

En México, el 85% del frijol se cultiva durante el ciclo de primavera-verano en diversas regiones del país entre ellas, la semiárida y la tropical húmeda baja, en condiciones de temporal con 250 a 400 mm de precipitación durante el ciclo del cultivo, con un rendimiento promedio de 450 kg/ha (Acosta Díaz *et al.*, 2004), en la que sobresalen los estados de Zacatecas, Sinaloa y Durango (FAOSTAT, 2017). El frijol representa un cultivo clave en la dieta nacional; el consumo anual per cápita es de 9.9 kg. Durante 2016 las 1.08 millones de toneladas generadas cubrieron 89.24% de consumo nacional. Pero, por otro lado, en el periodo 2003-2016 se observó una reducción acumulada en la superficie sembrada de 20.01% y de la producción en 23.03% (SAGARPA, 2017). Este comportamiento se debe a la producción de frijol en el mundo, que por lo general se realiza en condiciones de temporal, lo cual limita la capacidad de producción a los meses en los que se tienen las condiciones idóneas para el cultivo de frijol. Además, en América Latina, se ha estimado que el estrés hídrico reduce el rendimiento del frijol en 73% (Van Schoonhoven y Voyset, 1989).

Así mismo, el cambio climático ha provocado que la distribución y cantidad de lluvia que se presenta año con año esté variando constantemente, lo que ha provocado que ya no sea posible hacer predicciones al respecto, lo cual repercute en la producción de esta leguminosa.

El frijol no es reconocido como una especie resistente a la sequía, sin embargo, posee características que confieren escape (precocidad), evasión y tolerancia a la deshidratación, pero es factible identificar y utilizar dichas características en un

programa de mejoramiento genético (Acosta-Díaz *et al.*, 2004). Por ello la necesidad de hacer investigación sobre variedades resistentes a la sequía.

Con ayuda de la biotecnología, es posible el estudio de diferentes variedades de frijol, su interacción con el ecosistema, la evaluación de su comportamiento, el mejoramiento genético de especies, etc.

En este caso, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una herramienta útil para el estudio y caracterización de esta especie, ya que se pueden estudiar diferentes variedades bajo condiciones *in vitro*, simulando condiciones ambientales específicas para analizar las respuestas de diferentes líneas celulares, el crecimiento y comportamiento de las variedades de interés.

En este trabajo se realizó la caracterización de dos variedades de frijol, Bayo Madero y Pinto Saltillo, de las cuales la primera es susceptible a la sequía y la segunda resistente. Se establecieron condiciones de germinación *in vitro* y en invernadero; inducción de callo a partir de dos explantes (hoja y raíz). A partir de estos explantes se caracterizó su crecimiento mediante cinéticas de crecimiento en callo y células en suspensión. Estos cultivos se sometieron al efecto de agente que causa estrés simulando las condiciones de sequía PEG (8000) a diferentes concentraciones (0, 3%, 6%) y se evaluó el crecimiento en peso fresco, peso seco, turbidez y contenido de proteína. Por último, se realizó un ensayo de regeneración de embriones inmaduros.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol, como se muestra en la figura 1, es una planta anual, herbácea y termófila de tallos delgados y débiles, cuadrangulares, a veces rayados púrpura, hojas trifoliadas, ápice acuminado, laterales más o menos tubulosos y estandarte redondeado. Alcanza una altura de 50 a 70 cm y sus raíces se desarrollan con una raíz pivotante principal y muchas ramificaciones. Se cultiva principalmente para obtener las semillas. El fruto es una vaina curvada y dehiscente (se abre naturalmente cuando está madura), la cual puede medir de 10 a 12 cm. Las temperaturas óptimas para el desarrollo oscilan entre 10-27°C, el pH fluctúa entre 6.5-7.5 debido a la disponibilidad de los elementos nutritivos del suelo a este pH, pero se comporta bien en terrenos que tienen un pH de 4.4-5.5 (Debouck e Hidalgo, 1985, SAGARPA, 2016).



**Figura 1. Planta de *Phaseolus vulgaris* L. en maduración de fruto.**

#### 2.1.1. Taxonomía del frijol

Esta especie es el prototipo del género *Phaseolus*, su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L. asignado por Linneo en 1753.

El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 35 especies, de las cuales se cultivan 4: *P. vulgaris* L., *P. lunatis* L. *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *Latifolius* Freeman. Su taxonomía se muestra a continuación en la figura 2.

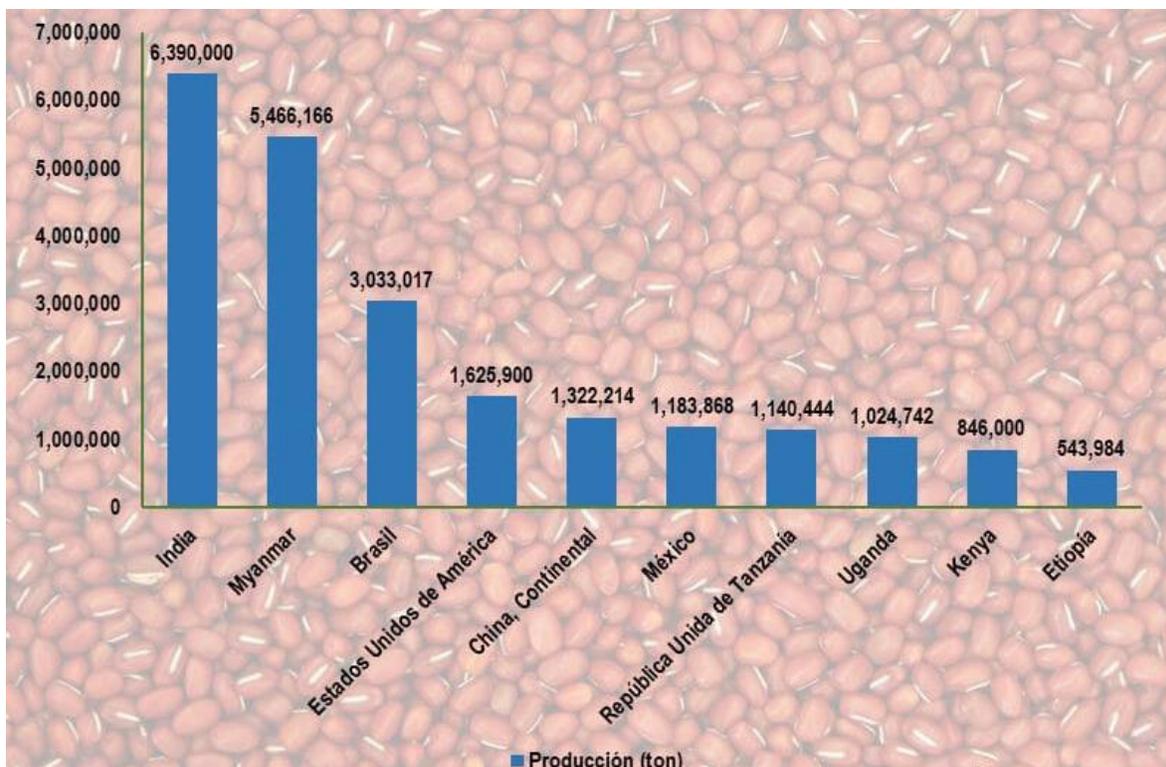
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Faboideae
Tribu:	Phaseoleae
Subtribu:	Phaseolinae
Género:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>Phaseolus vulgaris</i> Linneo
Sección:	<i>Phaseolus</i>

**Figura 2. Taxonomía de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) CONABIO, 2009.**

### **2.1.2. Importancia del frijol**

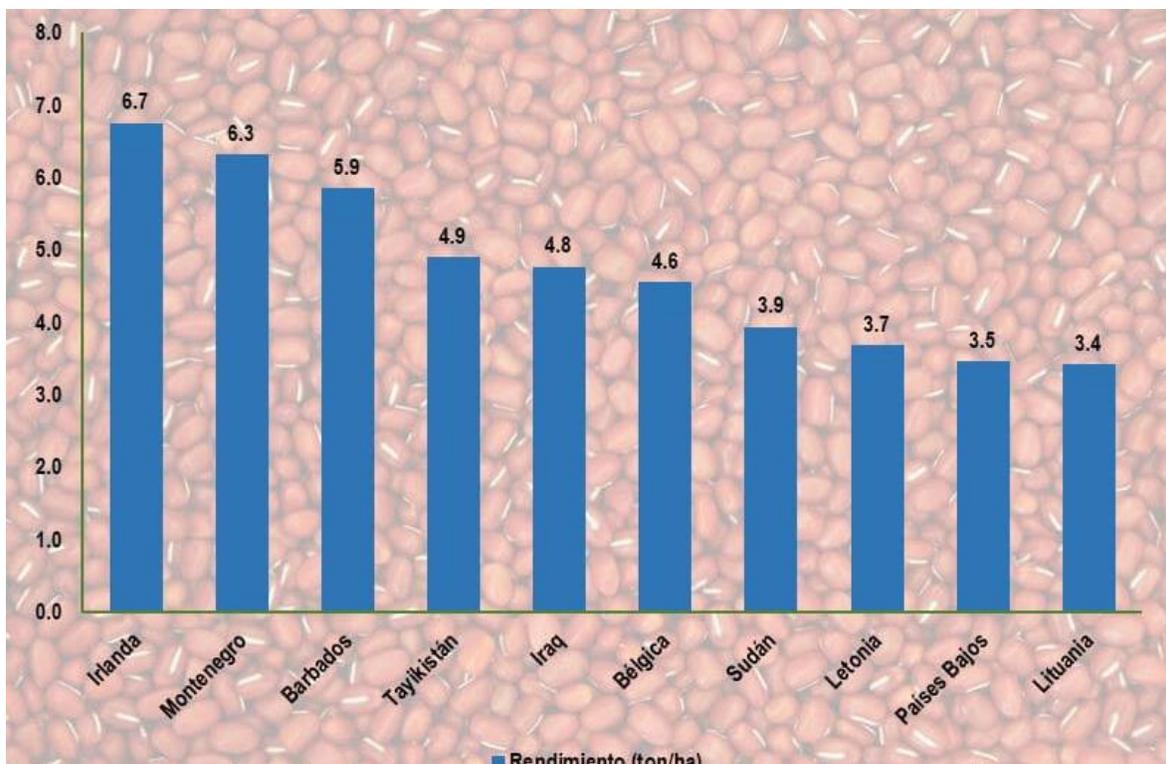
Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol es de las más importantes, ya que se encuentra distribuido en todos los continentes y es base esencial de la dieta en el Norte, Centro y Sudamérica (Ulloa, 2011).

De acuerdo con datos reportados por la FAO, durante el 2017, los países con mayor producción de esta leguminosa fueron India, Myanmar y Brasil; dejando a México en el sexto lugar de producción, como se observa en el gráfico 1.



**Gráfico 1. Producción mundial de frijol en 2017 (FAOSTAT, 2017).**

En México del año 2016 al 2017 la producción obtenida aumentó 8.7 %, la superficie cosechada aumentó 3.1 % y el rendimiento promedio aumentó 5.4 %. Pese a esto, México no figuró dentro de los 10 países con un mejor rendimiento de cosecha, como se observa en el gráfico 2.



**Gráfico 2. Rendimiento mundial de frijol en 2017 (FAOSTAT, 2017).**

Es decir, aunque México tenga los medios para una producción grande de esta leguminosa, el rendimiento que éste produce es muy bajo debido a que, al ser una leguminosa que se siembra por temporadas, está sujeta a los cambios climáticos, los cuales son cada vez más variables. Lo que ocasiona un aumento o disminución en la temperatura, y de igual manera en la frecuencia de lluvias. En cualquier caso, se ve afectada la producción ya que se modifican las condiciones necesarias para el cultivo.

Dentro del país, el frijol es el cuarto cultivo en importancia por la superficie sembrada, después del maíz de grano, pastos y el sorgo de grano; por el valor de la producción primaria que genera, ocupa la undécima posición, considerando cultivos cíclicos y perennes.

Según datos de la FAO, en el 2017 las entidades federativas con mayor producción en el año 2017 fueron Zacatecas (33.8%), Sinaloa (13.4%), Durango (10.9%) y Chihuahua (7.4%). En Sinaloa se cultiva en el ciclo otoño-invierno, con cosechas

concentradas en febrero, mientras que en las otras entidades mencionadas se cultiva en el ciclo primavera-verano, con los mayores volúmenes de cosecha en noviembre y diciembre.

Las variedades de frijol más importantes que se producen en México son: negro (31.5% del volumen total en el 2017), pinto (29.0%), de color —principalmente flor de mayo, flor de junio y bayo— (17.7%) y azufrados (17.6 por ciento).

### **2.1.3. Información nutrimental**

El frijol es conocido por sus propiedades nutritivas las cuales se asocian a su alto contenido proteínico y en menor medida a su contenido de carbohidratos, lípidos y vitaminas.

Dependiendo de la variedad y como se observa en la tabla 1, el frijol se compone en un 14 al 33% de proteína; siendo rico en lisina, fenilalanina y tirosina, pero deficiente en metionina y cisteína. En cuanto a carbohidratos, constituyen del 52 al 76%, en donde el principal componente es el almidón, aunque también es una buena fuente de fibra ya que contiene de 14 a 19%, además que hasta la mitad se encuentra de forma soluble. Esta fibra está presente en forma de pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina. Por último, los lípidos corresponden del 1.5 al 6.2%, constituidos por acilglicéridos donde los ácidos grasos predominantes son mono y poliinsaturados. También el frijol se considera fuente de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de vitaminas como la tiamina, niacina y ácido fólico (Ulloa, *et al.* 2011).

**Tabla 1. Composición proximal de frijol (crudo) (CONACYT, 2016).**

<b>Macronutrientes</b>	<b>g/100 gramos</b>	<b>Minerales</b>	<b>mg/100 g</b>
<b>Calorías</b>	333 Kcal	Calcio	228
		Fósforo	407
		Hierro	5.5
		Magnesio	140
		Sodio	24
		Potasio	1406
		Zinc	2.8
<b>Fibra</b>	4.3	<b>Vitaminas</b>	<b>mg/100 g</b>
		Tiamina	0.62
		Riboflavina	0.14
		Niacina	1.7
		Piridoxina	0.4
		Ácido fólico	0.4
<b>Grasas</b>	1.8	<b>Lípidos</b>	<b>g/100 g</b>
		Colesterol	0.0
		Saturados	0.12
		Monoinsaturados	0.06
		Poliinsaturados	0.18
<b>Proteínas</b>	19.2	<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/100 g</b>
		Isoleucina	927
		Leucina	1685
		Lisina	1593
		Metionina	234
		Fenilalanina	1154
		Treonina	878
		Triptófano	223
		Valina	1016
		Arginina	1257
Histidina	627		
<b>Carbohidratos</b>	61.5		

También existen compuestos químicos que interfieren con el aprovechamiento de los nutrientes del frijol. Los inhibidores de tripsina son inhibidores proteínicos que generan hipertrofia pancreática; los taninos disminuyen la digestibilidad de proteínas, limitan la biodisponibilidad de minerales como hierro y zinc; además de que contiene ciertos oligosacáridos como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa los cuales se fermentan en ácidos grasos de cadena corta y gases, los cuales se acumulan en el colon, lo que ocasiona flatulencias.

Pero, durante la cocción, disminuyen o incluso se llegan a eliminar estos factores antinutricionales, aunque, por otro lado, el almidón queda indisponible durante este proceso.

Además, el frijol al ser un alimento funcional, ciertos componentes se consideran fitoquímicos ya que tienen un beneficio a la salud, como la fibra que tiene un efecto hipocolesterolémico ya que disminuye hasta un 10% el colesterol en sangre. Por otro lado, los inhibidores de tripsina confieren protección contra rotavirus, inhiben carcinogénesis y pueden ser agentes quimiprotectores ya que protegen al organismo de ciertos efectos secundarios de ciertos tratamientos. Las lectinas disminuyen el crecimiento de linfomas no-Hodgking, los cuales provocan cáncer del tejido linfoide. Por último, el ácido fítico reduce el riesgo de cáncer de colon ya que tiene un alto poder antioxidante, al igual que los taninos.

#### **2.1.4. Variedades de frijol**

Las variedades con las que se trabajó en esta investigación fueron Bayo Madero y Pinto Saltillo.

Bayo Madero muestra una susceptibilidad a sequía. Es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado, las guías son cortas, sin capacidad para trepar (CIAT, 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 (Acosta-Gallegos, 1982). Es una variedad tolerante a antracnosis, roya, tizón común y tizón de halo y llega a presentar rendimientos de

604 a 1499 kg/ha (Rosales *et al* ,2014; Acosta-Gallegos, 1982; Acosta-Díaz *et al*, 2004).

Pinto Saltillo es una variedad mejorada de frijol, resistente a sequías y enfermedades las cuales son las pudriciones de raíz (causadas principalmente por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp.*), los tizones bacterianos (*Xanthomonas campestris pv. phaseoli* y *Pseudomonas phaseolicola*); antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y roya (*Uromyces appendiculatus var. appendiculatus*) (Campos, 1987; Rosales *et al.*, 2004). Florece entre 38 y 60 días después de la siembra y muestra un intervalo para alcanzar la madurez fisiológica entre 87 y 115 días. La variación del número de días a la floración y madurez es causada por las características del sitio y las condiciones de siembra. La fecha de la madurez puede retrasarse aún más (120 días) en condiciones de riego y siembras tempranas, ya que Pinto Saltillo es sensible al fotoperiodo, por lo que cuando es sometida a días largos (cerca de las 13 h de luz solar) incrementa la duración de sus etapas de desarrollo (Sánchez *et al*, 2006). Esta variedad se derivó del cruzamiento múltiple entre los progenitores Hidalgo 77////MAM 30///F1 (Michoacán 91- A/BAT 76) //F1(BAT 93/Ecuador 299). Este cruzamiento, codificado como MX8738, fue realizado como parte de un proyecto colaborativo iniciado en 1990 entre el INIFAP y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (INAFAP, 2006).

## **2.2. Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. 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 tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva y Pérez, 2005).

## **2.2.1 Factores que afectan el crecimiento y morfogénesis**

Los principales factores que afectan el crecimiento y la morfogénesis, es decir, el desarrollo de tejidos y órganos de la planta, de los cultivos vegetales *in vitro* son: genotipo, medios de cultivo, condiciones ambientales controladas y factores intrínsecos de la planta donadora de explantes (George y Sherrington, 1984).

### **2.2.1.1. Genotipo**

En este caso el genotipo se puede tomar como sinónimo de variedad, ya que es debido al genotipo que existen variedades diferentes dentro de la misma especie.

Este factor es el más influyente de los anterior mencionados, ya que se ha reportado que, variedades muy similares de plantas expresan diferentes respuestas de formación, crecimiento, peso y proliferación de callo (punto 2.2.2.1), formación de brotes adventicios, enraizamiento, embriogénesis y organogénesis, etc. (George y Sherrington 1984).

### **2.2.1.2. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son soluciones que cuentan con los nutrimentos necesarios para el crecimiento, desarrollo y modulación de la respuesta morfogénica del cultivo vegetal en condiciones *in vitro*.

El éxito del uso de cultivo de tejidos vegetales depende de la adecuada selección de los componentes del medio de cultivo que se va a utilizar, ya que se debe de proveer al tejido los nutrientes necesarios que capta de forma regular del suelo (George, 2008), seleccionar correctamente los reguladores de crecimiento dependiendo de la respuesta que se busca, definir el estado del medio, sólido o líquido, dependiendo del objetivo del experimento, ajustar factores como pH y la temperatura para optimizar el desarrollo del tejido.

Existen varias composiciones de medios, sin embargo, el más utilizado es el medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) el cual es apto para la mayoría de las especies,

excepto para las más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina (Murashige y Skoog, 1962).

A continuación, en la tabla 2 se presentan algunos de los componentes que se utilizan en el cultivo de tejidos vegetales, así como su función.

**Tabla 2. Componentes de los medios de cultivo (Tomado de Contreras F. 2016, y Saran S. y Kumar P, 2013).**

Tipo	Componente	Función
<b>Macronutriente:</b> <b>Se requieren en cantidades mM</b>	N <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> , NO <sub>3</sub> )	Determina la tasa de crecimiento del tejido, en forma de amonio puede resultar benéfico o nocivo para algunos tejidos. Puede estar en forma orgánica, aminoácidos.
	P (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	Se utiliza en síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas. Provee energía a respiración, fotosíntesis y regulan actividad de proteínas.
	K <sup>+</sup> (KNO <sub>3</sub> )	Actúa en la división celular normal, síntesis de carbohidratos y clorofila, asimilación de N <sub>2</sub> , regula pH y ambiente osmótico en la célula.
	Ca <sup>2+</sup> (CaCl)	Componente de pared celular, forma enlaces coordinados en la membrana celular. Cofactor enzimático en la hidrólisis de ATP.
	Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> )	Elemento central para la porfirina y clorofila, cofactor enzimático. Elemento de unión en subunidades ribosomales.
	S (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Parte de aminoácidos y algunas vitaminas, presente en síntesis de lípidos.
<b>Micronutrientes:</b> <b>Se adicionan en concentraciones mucho menores que los macronutrientes.</b>	Mn <sup>2+</sup> (MnSO <sub>4</sub> )	Reemplaza al Mg en algunas enzimas. Define estructura de las metaloproteínas involucradas en respiración y fotosíntesis.
	Zn <sup>2+</sup> (ZnSO <sub>4</sub> )	Componente de metaloproteínas como RNA polimerasa.
	B (BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> )	Integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y pared celular, mantiene actividad meristemática.
	Cu <sup>2+</sup> (CuSO <sub>4</sub> )	Cofactor en enzimas relacionadas al oxígeno (SOD)
	Mo (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> )	Cofactor enzimático necesario para la utilización de nitrógeno

	Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> )	Componente metálico de la vitamina B12. Protección contra metales pesados.
	I (KI)	Ayuda en el crecimiento de algunos tejidos como la raíz
	Fe (FeSO <sub>4</sub> )	Se utiliza en cloroplastos, mitocondria y peroxisomas para reacciones redox.
	Na <sup>+</sup> (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> )	Estabilizador osmótico
<b>Fuente de carbono</b>	Sacarosa, Fructuosa, Maltosa	Al esterilizarse promueve su hidrolisis lo cual mejora el crecimiento de los tejidos. También actúa como regulador osmótico
<b>Vitaminas</b>	Tiamina	Parte de coenzimas.
	Mio-inositol	Mensajero secundario.
	Ácido nicotínico	Forma parte de las coenzimas NAD y NADP <sup>+</sup> que intervienen en la transferencia de hidrógeno.
	Piridoxina	Participa como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos.
<b>Aminoácidos:</b>	Glicina	Fuente de N orgánico. En altas concentraciones puede ser inhibidor enzimático.
<b>Reguladores de crecimiento</b>	Auxinas -AIA -AIB -ANA -2,4-D.	Participan en crecimiento celular, acidificación de pared celular, inicio de división celular, formación de tejidos no diferenciados, formación de órganos (meristemas). Afectan enraizamiento, elongación de tallos y entrenudos, senescencia y la abscisión de hojas.
	Citocinas -Kinetina - BA	Promueven división y crecimiento celular de callos. Estimulan síntesis de proteínas, controlan ciclo celular, rompen latencia de yemas axilares, ayudan en la diferenciación

	-TDZ	de brotes. Promueven brotación de yemas axilares, estimulan expansión de hojas y retardan senescencia.
	Giberelinas AG <sub>3</sub>	Se usa en la elongación de brotes e internudos, desarrollo de plántulas obtenidas de brotes adventicios.
<b>Antioxidantes</b>	PVP	Es una poliamida capaz de formar puentes de hidrogeno, con lo que retarda la oxidación.
	Ácido ascórbico	Degrada especies reactivas de oxígeno evitando las reacciones en cascada ocasionada por los radicales libres.
	Carbón activado	Retrasa la entrada de polifenoles al medio, pero se adhiere a auxinas (AIA).
<b>Agentes osmóticos</b>	PEG, manitol y sorbitol	Emulan sequía porque disminuye la disponibilidad de agua, disminuye el potencial hídrico, disminuye cantidad de agua libre. También influye en la maduración de embriones somáticos. Induce permeabilidad en las membranas, mediante la inducción de poros transitorios o daño reversible de la membrana, permite paso del DNA foráneo y de macromoléculas, a través de la membrana hacia el interior de la célula.

### **2.2.1.3. Condiciones de incubación**

Los cultivos deben de mantenerse en incubadoras o cuartos con condiciones como la iluminación, temperatura y humedad puedan ser controladas. La tasa de crecimiento depende de la temperatura y en ciertos casos, de la iluminación de los cuartos de incubación. (George *et al.*, 2008). Otros factores importantes para considerar son la humedad relativa, que interviene con el desecamiento de los cultivos; y el tamaño de los contenedores donde se subcultivan los tejidos, debido a sustancias volátiles como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etileno, etc., presentes en el aire dentro del contenedor (George y Sherrington, 1984).

### **2.2.1.4. Factores endógenos de la planta donadora**

La planta utilizada como fuente primaria de explantes para el cultivo de tejidos se le denomina planta madre. La etapa y estado fisiológico, así como el ambiente donde se desarrolló la planta madre influye en la respuesta celular que se va a obtener.

Los principales factores que afectan el estado fisiológico de la planta madre son el estrés, ya que se obtiene una mejor respuesta cuando la planta madre no fue sometida a estrés; la estacionalidad ya que los cambios de temperatura, duración del día, intensidad de luz afecta en los niveles de carbohidratos almacenados, proteínas y reguladores de crecimiento intrínsecos de la planta (George y Sherrington 1984).

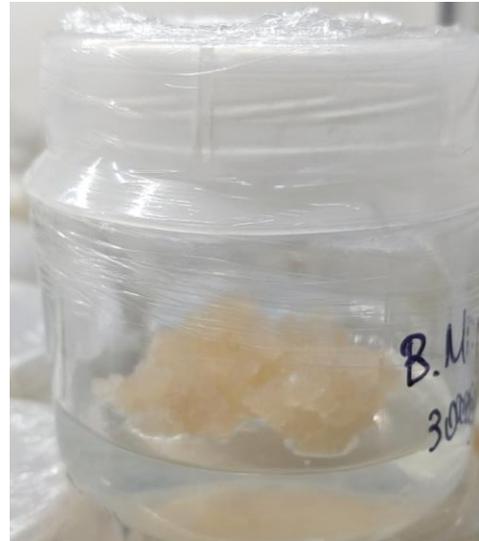
La correcta elección del explante es crucial para asegurar el cumplimiento del objetivo que se busca en el estudio, ya que un explante es la sección del órgano, tejido o células de las cuales se parte para iniciar el cultivo *in vitro*. El explante a utilizar depende del tipo de cultivo que se va a iniciar, el propósito del mismo y la especie de planta que se va a usar (George *et al.*, 2008). En este caso se utilizaron los explantes de hoja y raíz.

## 2.2.2. Tipos de cultivos

Debido a la gran variedad de estudios que se pueden realizar utilizando el cultivo de tejidos vegetales, definir el tipo de cultivo a utilizar también es necesario para un análisis correcto de la respuesta celular que se busca evaluar.

### 2.2.2.1 Cultivo de callo

Los cultivos de callo (figura 3) se inician a partir de hojas, tallos, ápices, embriones, peciolos o tejidos que presente células meristemáticas. Por definición, el callo es una masa amorfa de células no diferenciadas de tejido parenquimatoso con zonas meristemáticas, es decir, es tejido desorganizado que cuenta con una alta capacidad de dividirse, además que cuenta con zonas de células que tienen la capacidad de diferenciarse en nuevos tejidos. No cuenta con una estructura organizada ni con una diferenciación



**Figura 3. Callo de raíz proveniente de la variedad Bayo Madero.**

celular. Esta heterogeneidad se debe a las condiciones del cultivo y al explante del que proviene, por lo que en un mismo callo se pueden encontrar distintos tipos celulares. Puede ser compacto, friable, seco, húmedo, claro u oscuro. Estas características pueden cambiar con el tiempo debido a los cambios genéticos o las modificaciones que se hagan al medio de cultivo (Smith, 2013).

La formación y mantenimiento del callo está regido por reguladores de crecimiento. Para la inducción del callo se hacen heridas al explante para promover la liberación de auxinas y citocinas, además de agregar reguladores de crecimiento al medio de cultivo para inducir la división celular y con ello lograr la formación del callo. Se realizan subcultivos periódicos a medio fresco para promover la proliferación del callo y lograr separarlo del cultivo madre. El callo puede tener varios usos como ser

material de inicio para células en suspensión, ser el sistema de estudio para estudios morfo genéticos, producir metabolitos secundarios, etc.

### **2.2.2.2. Células en suspensión**

Para iniciar los cultivos de células en suspensión es necesario inocular con callo friable un medio líquido el cual se mantiene en agitación constante. La agitación ejerce una pequeña presión sobre el tejido, fraccionándolo en pequeños agregados celulares y en células individuales. Además, se promueve la distribución homogénea de estos agregados al medio y proporciona la oxigenación constante en los cultivos.

Al ser medio líquido se asegura la exposición homogénea de las células al medio que las rodea, permitiendo también su correcta oxigenación e intercambio gaseoso de las células con el medio. Debido a esto la tasa de división es mayor en este tipo de cultivos (Smith, 2013).

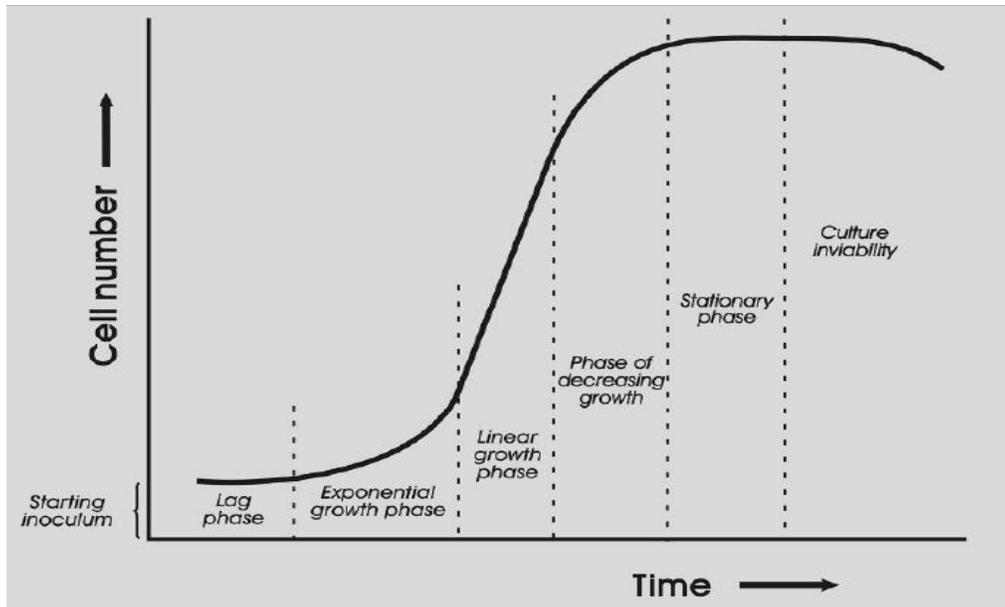
### **2.2.3. Evaluación del crecimiento**

El crecimiento se define como el aumento irreversible de masa de un organismo vivo, órgano o célula (UNSL, 2010). Existen varias metodologías para evaluar el crecimiento celular, algunas son:

- **Peso fresco:** En esta metodología se registra el peso del cultivo (callo o células en suspensión) sin someterlo a ningún tratamiento térmico.
- **Peso seco:** En este caso el cultivo en cuestión seca hasta que se deshidrate y alcance un peso constante para posteriormente registrar su peso.

#### **2.2.3.1. Cinética de crecimiento**

Si se cuantifica el cambio en el peso se puede obtener un gráfico de variación de un parámetro (X) en función del tiempo (t), lo que da origen a una curva sigmoidea, que representa el crecimiento celular la cual se representa en la figura 4.



**Figura 4. Curva de crecimiento de células vegetales (George et al, 2008).**

En las curvas de crecimiento las fases características son:

- Fase inicial o lag: Corresponde a un período de adaptación de las células de un cultivo, que son transferidas a un medio nutritivo fresco. En esta etapa se inician una serie de cambios metabólicos, entre los que se encuentran la activación del sistema energético (rutas glicolíticas y de las pentosas) lo que provoca un aumento en las concentraciones de  $\text{NADP}^+$  y un incremento en la actividad de invertasa, que se traduce en una mayor síntesis de pared celular y contenido de RNA en la célula. En esta fase, las células se preparan para la división celular.
- Fase de división celular, logarítmica o exponencial: Es la fase en la que se promueve la división celular. En esta etapa las células son pequeñas, isodiamétricas y con núcleos muy prominentes por el contenido de DNA, no se presenta de tamaño pequeño, no se presenta la diferenciación celular, ya que está destinada todos sus esfuerzos a dividirse.
- Fase estacionaria: Esta fase representa el cese de la división celular, también se ve disminuida la actividad de los sistemas energéticos. En esta fase se puede originar la diferenciación estructural y bioquímica del cultivo, con la

consecuente activación de regiones meristemáticas presentes en los agregados, lo que provocaría la organogénesis de los cultivos. En algunos cultivos en esta etapa se activa o incrementa la producción de metabolitos secundarios, debido a la baja actividad en las rutas del metabolismo primario. (UNSL, 2010).

A partir de las curvas de crecimiento, es posible calcular ciertos parámetros los cuales nos pueden brindar información más específica sobre el crecimiento del cultivo. Estos parámetros son: índice de crecimiento (IC), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación celular (td).

$$IC = \frac{x - x_0}{x_0} \quad \mu = \frac{\ln \frac{X_0}{X}}{t - t_0} \quad td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

*X: biomasa inicial*

*X<sub>0</sub>: biomasa final*

*t: tiempo inicial*

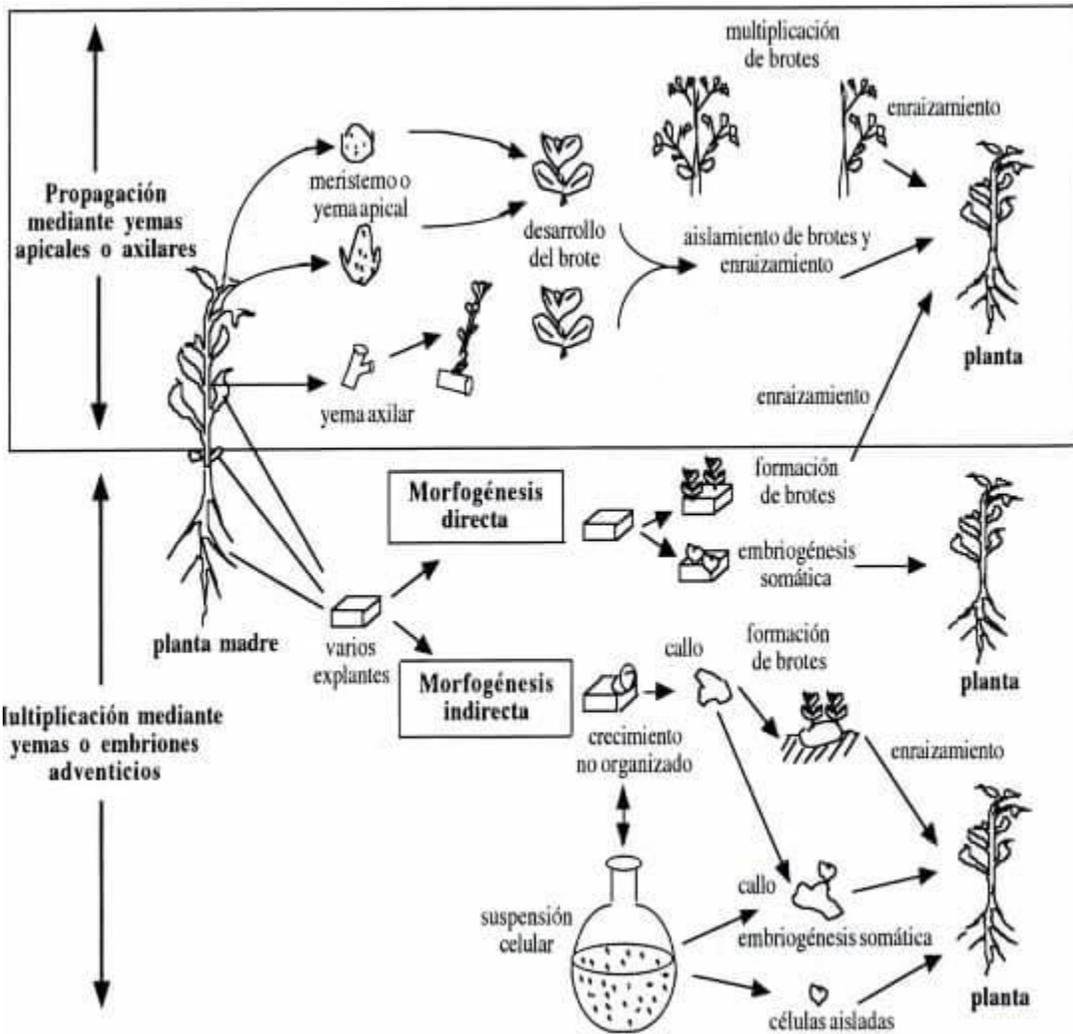
*t<sub>0</sub>: tiempo final*

#### **2.2.4. Regeneración**

La regeneración de plantas es posible gracias al principio de totipotencia, este principio indica que las células vegetales tienen la capacidad de, a partir de estructuras diferenciadas y especializadas, como hojas o brotes, regresar a su estado meristemático basal.

La regeneración a partir de células diferenciadas comienza por la desdiferenciación de las células a su estado meristemático basal, posteriormente, con la división celular, se pueden formar células desorganizadas (callos). Existen otros casos en los que la regeneración se da directamente de las células meristemáticas, este proceso se denomina re-diferenciación (Smith *et al.* 2019).

Esta totipotencialidad se expresa vía organogénesis o embriogénesis dependiendo de la planta y los reguladores de crecimiento que se utilicen, en la figura 5 se pueden ver las diferentes rutas de regeneración.



**Figura 5. Rutas de regeneración empleadas en cultivo de tejidos vegetales (Lindsey & Jones, 1989).**

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula no cigótica, es decir, donde no ocurrió la unión de gametos. Estos embriones somáticos cuentan con la característica de desarrollarse en individuos con estructura bipolar (raíz y brote) el cuál se puede desarrollar en una plántula completa (Freire, 2003).

Si los embriones somáticos se obtienen directamente de las células aisladas se denomina embriogénesis directa, si primero se da la formación de callo entonces se le denomina embriogénesis indirecta.

Para esta ruta es común el uso de auxinas para la inducción de embriones y posteriormente el uso de Ácido abscísico (ABA).

En la organogénesis, se induce al tejido vegetal a formar órganos que eventualmente se desarrollan en plántulas completas; se da una propagación asexual de las plantas sin necesidad de tejidos meristemáticos.

Cuando el tejido vegetal desarrolla raíces o brotes se trata de una organogénesis directa, por otro lado, si primero se desarrolla callo antes de la formación de los órganos entonces se trata de una organogénesis indirecta (Chieng *et al.* 2014).

Primero se da la desdiferenciación, donde se da una reversión a un estado más plástico y flexible de las células que puede o no resultar en la formación de callo; después de la inducción donde el tejido celular sigue vías genéticas específicas dirigidas para la formación de raíz o de brotes, es el punto donde el tejido se puede remover del medio de inducción. Por último, se da la diferenciación donde morfológicamente de diferencia el tejido vegetal (Trigiano y Gray, 2004).

Los reguladores de crecimiento más utilizados para esta ruta son la citocina 6-N-Bencilaminopurina (BA), en combinación con Ácido 1-naftalenacético (ANA) y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las variaciones en las concentraciones de estos reguladores determinarán si se trata de una organogénesis directa o indirecta.

### **2.2.5. Estrés en plantas**

La falta de agua en los suelos resulta en el incremento de la salinidad de estos, la salinidad es el principal estrés abiótico que afecta el crecimiento, el rendimiento y la calidad de los cultivos a nivel mundial (Bojórquez, 2015). Esto afecta al desarrollo de las plantas ya que el agua es el principal componente en los tejidos vegetales, algunas de sus funciones son el movimiento de moléculas dentro y entre células, da estructura y estabilidad a moléculas, integridad físico-química a la pared, etc.

Debido a diversos factores, como el cambio climático, se espera que para el 2050 más del 50% de los suelos disponibles para la agricultura se perderán debido a la salinidad (Flowers, 2004).

El exceso de sales solubles en el suelo impone tres tipos de estrés las plantas: osmótico, iónico y el oxidativo como se ilustra en la figura 6. Estos en conjunto reducen la tasa fotosintética, inducen clorosis y necrosis de las hojas, y causan cambios en la arquitectura de la raíz. Además, reducen la absorción e inducen el flujo masivo de agua y de iones de las células vegetales (Munns y Tester, 2008; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012).

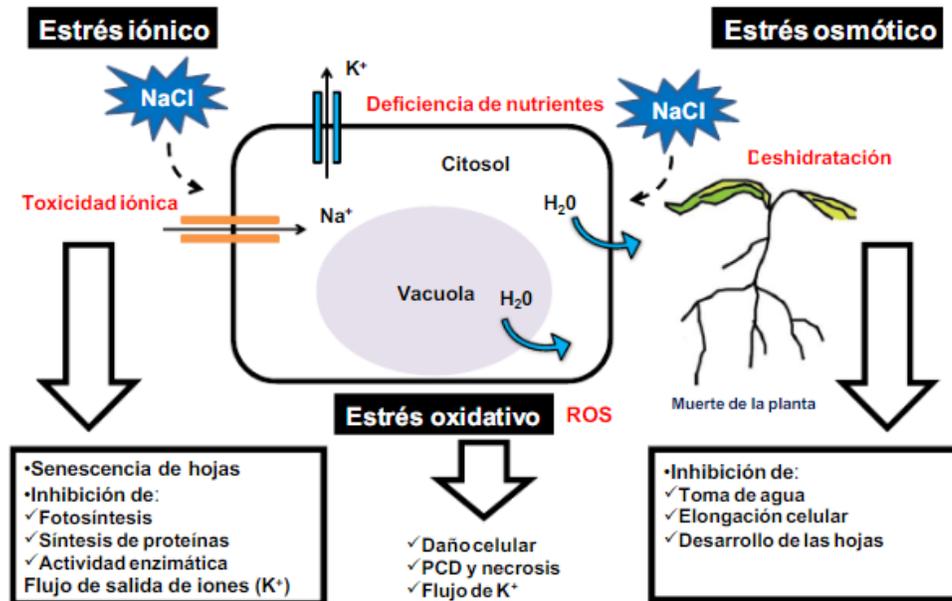
El estrés osmótico ocurre cuando el potencial hídrico del suelo disminuye con el aumento de la concentración de sales y es mucho más bajo en comparación con el potencial hídrico de la planta (Bojórquez, 2015). El agua viaja desde las zonas donde el potencial hídrico es mayor hacia donde es menor. Este potencial se define con la siguiente ecuación:

$$\psi_w = p - s$$

Donde “ $\Psi_w$ ” es el potencial hídrico; “ $p$ ” es la presión de turgor o la fuerza hidrostática ejercida en la célula vegetal contra la pared celular y es de signo (+), y “ $s$ ” es la presión osmótica, que es una medida de la concentración de los solutos (Taiz y Zeiger, 2006). La interacción del agua con los solutos disueltos en ésta tiene un efecto negativo sobre el  $\Psi_w$ , ya que disminuye la cantidad de agua libre disponible en el sistema, por lo que se resta en la ecuación (Nilsen y Orcutt, 1996).

Posteriormente, el estrés salino se presenta con la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . La entrada de  $\text{Na}^+$  en las células de la raíz ocasiona la despolarización del potencial de membrana disminuyendo la absorción e induciendo el flujo de salida del K. La hiperacumulación de  $\text{Na}^+$  principalmente en las hojas, disminuye la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ . Una baja concentración citosólica de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  inhibe la actividad enzimática y la síntesis de proteínas (Blaha *et al* 2000; Shabala y Cuin, 2007; Roy *et al* 2014). En última instancia, el estrés oxidativo se da cuando se forman especies reactivas de oxígeno (ROS) estos se forman naturalmente a causa del metabolismo aeróbico de

la planta, pero aumentan como respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico. Los daños por ROS causan inhibición de la actividad enzimática y la síntesis de proteínas, peroxidación de lípidos, así como daño a las estructuras de ácidos nucleídos y membranas (Amooaghaie,2011).



**Figura 6. Tipos de estrés en plantas (Bojórquez, 2015).**

Existen diferentes mecanismos intrínsecos de la planta que se activan al estar bajo estrés. Cuando la exposición a estrés se da de manera lenta se presenta una aclimatación, la cual tiene una respuesta en el crecimiento, como la disminución de expansión foliar y aumento de crecimiento radicular, ya que se promueve el crecimiento de la raíz para la búsqueda de agua, mientras que la parte aérea deja de crecer.

Por otro lado, en algunas plantas existe el metabolismo C<sub>4</sub>, en este se genera una separación física entre el proceso de asimilación del CO<sub>2</sub> (células de mesófilo) y su reducción a carbohidratos (parénquima perivasculares). Debido a la acumulación de CO<sub>2</sub> en este sitio, donde se da la carboxilación de la ribulosa bifosfato, resulta en una supresión de la oxigenación. El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) consiste en una separación temporal de la fijación de CO<sub>2</sub> respecto a reacciones

dependientes de la luz. El CO<sub>2</sub> se acumula en la noche, cuando los estomas están abiertos, como ácido málico y se almacena en vacuolas, durante el día se cierran los estomas y con esto se previene la pérdida de agua. El ácido málico se reduce a carbohidratos en el ciclo de Calvin. El cierre de estomas está mediado por el ABA, al aumentar su concentración se produce pérdida de iones K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> o malato<sup>2+</sup> lo que provoca una salida de agua al citoplasma causando el cierre del estoma (Moreno L., 2009).

A nivel molecular ocurre una modificación de la expresión genética. Se da la modificación de expresión de enzimas para síntesis de osmolitos orgánicos, lo cual produce un ajuste osmótico. Estos osmolitos pueden ser polioles, metilaminas, aminoácidos libres y derivados de aminoácidos. Este proceso se presenta principalmente en vacuola y los osmolitos no interfieren con sustratos o cofactores enzimáticos. También existen proteínas con función protectora como LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins) que actúan como antioxidantes ya que protegen a otras proteínas y membranas del daño por deshidratación. Estas proteínas se expresan durante la embriogénesis, antes del inicio de la desecación de la semilla. Su expresión está mediada por el ABA, y su función protectora se debe a que son moléculas hidrofílicas ricas en glicina y resistentes a las temperaturas altas. Además, existen factores de transcripción que median la respuesta de genes a estrés hídrico, la sobre-expresión de estos genes genera tolerancia al estrés (Moreno L., 2009).

### **2.3. Cultivos *in vitro* de frijol**

El frijol es una planta de interés para el desarrollo biotecnológico, por lo cual varios autores han estudiado esta planta y sus variedades con diferentes fines. La siguiente revisión bibliográfica, tabla 3, se enfoca en el estudio de la regeneración de *Phaseolus vulgaris* L. así como el efecto del estrés.

**Tabla 3.** Revisión bibliográfica de *Phaseolus vulgaris* L.

Objetivo	Variedades	Reguladores	Explante	Resultados	Autor
<b>Embriogénesis directa</b>	Flor de Julio Marcela, Flor de Mayo Anita	MS 100%, Myo-inositol 100 mg/l, Tiamina-HCl 1 mg/l, Sacarosa 3%, BA (0, 0.1, 5.0, 10.0 mg/l) AH (0, 20, 40 mg/l)	Ejes embrionarios	Para FJM, el tratamiento óptimo es BAP 10 mg/l y AH 40 mg/l y para FMA es BAP 10 mg/l y AH 20 mg/l	Delgado P. <i>et al.</i> , 2005
<b>Embriogénesis indirecta</b>	BAT93 (crema), BAT304 (negro), BAT 482 (blanco), ICA Pijao (negro), CIAP7247F (negro)	Germinación (GM): MS 100%, Tiamina 1mg/l, BAP 1.13mg/l, Sacarosa 3% Inducción (CIM): MS 100%, Vit. B5 0.2mg/l, TDZ 0.2 mg/l, AIA0.05 mg/l, Sacarosa 3% Regeneración (SRM): MS 100%, Vit. B50.2 mg/l, Sacarosa 3%, BAP (2.25, 4.5 6.75, 9.0 mg/l) Proliferación (CPM): MS 100%, Vit. B50.2 mg/l, AIA2%, Sacarosa3%, TDZ (0.02, 0.04, 0.2 mg/l)	Nudos cotidelonarios (CN), nudos cotidelonarios con uno y dos cotiledones (CN-1, CN-2)	La mayor inducción se obtuvo con CN-1 y CN-2. Para CIAP7247F la concentración óptima de TDZ es de 0.04 y su concentración de BAP para regenerar es de 2.5,4.5 mg/l	Collado R. <i>et al.</i> , 2013
<b>Embriogénesis directa</b>	Carioca	Germinación: MS 50%, TDZ 10 µM Regeneración: MS 100% MSB5 100% TDZ (1-10µM), BAP (1-10µM) y AgNO <sub>3</sub>	Capas celulares (0.3-0.5 mm) de epicótilo, hipocótilo, cotiledón y raíz	La concentración óptima para la regeneración fue MSB5 + BAP (10 µM) + AgNO <sub>3</sub> (10 µM)	Maria H, <i>et al.</i> , 2000

<b>Organogénesis directa</b>	Apetito G13637, Flor de Mayo Anita, ICA Palmar G4523, Pinto Saltillo	GM100%/MS 100%, Myo-inositol 100mg/l, Piridoxina 1mg/l, Tiamina 10mg/l, Sacarosa 2%, BAP 10mg/l, AH (0, 20 mg/l)	Embriones	El tratamiento óptimo para G13637, Flor de Mayo Anita y Pinto Saltillo es sales GM con o sin AH; para ICA Palmar es sales GM sin AH	Quintero A. <i>et al.</i> , 2010
<b>Organogénesis directa</b>	Provenientes de Costa Rica: Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar, Telire	MS 100%, Myo-Inositol 100mg/l, Tiamina 1mg/l, Sacarosa 3%, BAP (0, 5, 10 mg/l), AS (0, 20, 40 mg/l)	Ejes embrionarios	El tratamiento óptimo para Bribri es 5 mg/l BAP y 20 mg/l de AS, para Brunca 5 mg/l BAP y 40 mg/l de AS, para Guaymí 5 mg/l BAP y 20-40 mg/l de AS, Huetar 5 mg/l BAP y 40 mg/l de AS, Telire 5 mg/l BAP y 20 mg/l de AS o 10 mg/l BAP y 40 mg/l de AS	Gatica A. <i>et al.</i> , 2010
<b>Crecimiento bajo condiciones de sequia</b>	cv. Flamingo, cv. Coco	Siembra en suelo utilizando dos muestras diferentes: arena-arcilla, arcilla Control: riego 3 veces a la semana, Sequía: riego una vez a la semana Siembra en arena estéril inoculada con <i>Rhizobia</i> halotolerante aislada del experimento anterior	Semillas	La deficiencia de agua afecta el desarrollo de las plantas y el peso seco de los nodos. La sequía favorece el crecimiento de <i>Rhizobia</i> halotolerante. La cepa <i>E. meliloti</i> bv. <i>Mediterranense</i> tiene un efecto simbiótico con las plantas promoviendo el crecimiento en estrés.	Mnasri B. <i>et al.</i> , 2007

		Siembra en campo con inoculación de <i>E. meliloti</i> bv. <i>Mediterranense</i>			
<b>Efecto estrés en hoja y raíz</b>	<i>Phaseolus acutifolius</i> (TB), <i>Phaseolus vulgaris</i> (CB)	MS 100%, 2,4-D 2µM, Sacarosa 3%, Kinetina 0.5µM, PEG 10,000 (0, 10%)	Hoja, Raíz	Sin estrés, CB tiene mayor potencial osmótico y tasa de crecimiento relativo pero menor peso seco que TB; con estrés esto no se afecta en callo de hoja y raíz en TB, pero en callo de raíz en CB disminuye potencial osmótico, tasa de crecimiento y peso seco. CB y TB muestran reducción de hoja, vástago y raíz bajo estrés, es mayor para CB.	Mohamed F. <i>et al.</i> , 2008
<b>Efecto de estrés en hojas</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. <i>Hawkesbury Wonder</i>	Se plantaron semillas con riego diario cada 3h y con un litro de solución con 24mM de nitrato, para inducir estrés se retiró esta solución.	Hoja	Defoliación parcial causa incremento en asimilación de CO <sub>2</sub> , estrés prolongado causa decremento en la regeneración de Ruby	Caemmerer S. y Farquhar G., 1984
<b>Efecto de estrés en producción de proteínas</b>	<i>Phaseolus acutifolius</i> (PI-301-801, G-400-35, L-	Se indujo crecimiento en condiciones de invernadero, después de dos semanas se retiró el agua para inducir sequia	Hoja (contenido de agua)	<i>Phaseolus vulgaris</i> se ve más afectado en el contenido de que <i>Phaseolus acutifolius</i> , los genotipos PI-301-	Gonzales E. <i>et al.</i> , 2003

	<p>242-24, L-242-36, L-172),  <i>Phaseolus vulgaris</i> (Flor de Mayo Bajío)</p>		<p>801, G-400-35, L-242-24 fueron los mejores. Con el estrés comienza una síntesis <i>de novo</i> de proteínas de sequía, aumenta concentración de ornitina, ornitina aminotransferasa y prolina. L-242-24 y G-400-35 son los más resistentes ya que también tiene alta concentración de poliamidas.</p>	
--	--	--	--	--

### **III. OBJETIVOS**

Debido a que existe interés en la identificación de genes resistentes a la sequía en frijol, se ha propuesto encontrar parámetros de crecimiento susceptibles al estrés hídrico, además de lograr la regeneración de dos variedades de frijol, reportadas como resistente y sensibles a la sequía. Por ello, se plantearon los siguientes objetivos.

#### **3.1 Objetivo general**

Proponer metodologías experimentales para la regeneración y caracterización del crecimiento de cultivos celulares de dos variedades de frijol, Pinto Saltillo (resistente a sequía) y Bayo Madero (susceptible a sequía) bajo condiciones de estrés hídrico.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Germinación de semillas en condiciones *in vitro* e invernadero.
- Inducción, proliferación y mantenimiento de callos provenientes de dos explantes (hoja y raíz) a partir de dos variedades de frijol.
- Establecer y proliferar cultivos en suspensión de células a partir de callos provenientes de explantes de hoja y raíz de las dos variedades.
- Caracterizar el crecimiento de cultivos celulares bajo dos condiciones de estrés hídrico (PEG) a través de cinéticas de crecimiento, contenido de proteína, turbidez y de otros parámetros calculados como índice de crecimiento (IC), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular.
- Regenerar plantas a partir de embriones inmaduros utilizando dos explantes (eje embrionario y cotiledón) y diferentes medios.

### **IV. HIPÓTESIS**

Si la variedad de Bayo Madero es susceptible y Pinto Saltillo es resistente a sequía entonces existen diferencias genotípicas, por lo cual las respuestas de estas líneas celulares serán diferentes al ser sometidas a estrés hídrico.

La respuesta regenerativa de las variedades Bayo Madero y Pinto Saltillo será diferente debido a que presentan diferentes respuestas a los mismos reguladores de crecimiento.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Metodología general

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. Durante el desarrollo de la investigación se empleó la siguiente metodología que se presenta en la figura 7.

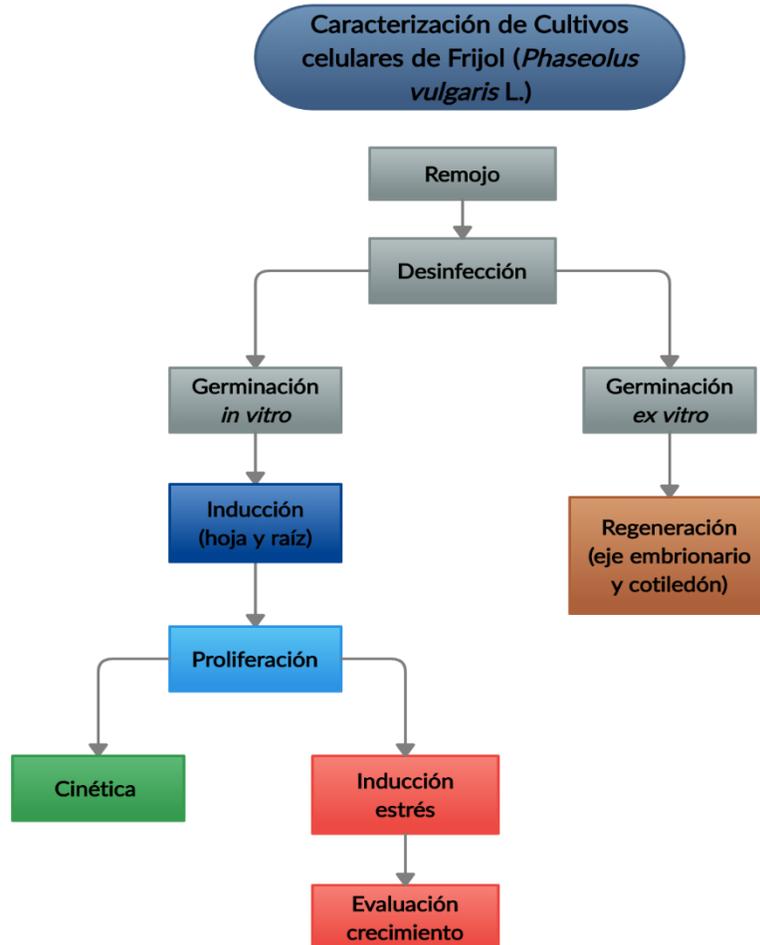


Figura 7. Diagrama de flujo experimental de la metodología general.

## 5.2 Material biológico

Se utilizaron semillas proporcionadas por el IBT de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) correspondientes a dos variedades: Bayo Madero (B.M.) y Pinto Saltillo (P.S.), como se muestra en la figura 8.



**Figura 8. Semillas de *Phaseolus vulgaris* L. A: Bayo Madero, B: Pinto Saltillo.**

## 5.3 Establecimiento de cultivos *ex vitro*

Para el establecimiento de las plantas en invernadero se probó el uso de dos sustratos diferentes: un sistema inerte, agrolita, previamente esterilizada (1.2 psi/18 min) y un sistema compuesto de tierra con agrolita, la cual es un sustrato inerte utilizado como mejorador de suelos, en proporción 3:1.

Para el sistema de agrolita, las semillas se desinfectaron previamente (punto 5.6.1) y se remojaron en ácido giberélico ( $AG_3$ ) ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) durante 24 h previa a la siembra. Para el sistema tierra-agrolita no se aplicó método de desinfección y se remojaron en  $AG_3$  ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) durante 48 h previo a la siembra, se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y con agitación a 110 rpm.

En todos los casos, el riego se realizó dos veces por semana y para el sistema de hidroponía, semanalmente se aplicó una solución hidropónica ( $2.3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Para el sistema de tierra-agrolita se aplicó solución hidropónica una vez al mes. La

composición de la solución es la siguiente: Nitrógeno (203 ppm), Fósforo (50 ppm), Potasio (236 ppm), Calcio (200 ppm), Magnesio (48 ppm).

#### **5.4 Medios de cultivo y condiciones de incubación**

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones Stock 100X de sales inorgánicas del medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) suplementado con diferentes concentraciones de vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores de crecimiento dependiendo del experimento que se realizó. El pH se ajustó utilizando HCl (1.0 y 0.1 N) y NaOH (1.0 y 0.1 N) según fuera necesario. Todos los medios se esterilizaron en una autoclave vertical a 121°C y a una presión de 1.2 psi, durante 18 min.

Los medios sólidos se les añadió un agente gelificante (Gelzán) a razón de 2.5 g·l<sup>-1</sup>.<sup>1</sup> Cuando se requirió adicionar algún compuesto termolábil, en campana de flujo laminar se agregaron los compuestos cuando el medio tuviera una temperatura aproximada a 40° C y, posteriormente se sirvió el medio en frascos previamente esterilizados.

Para los experimentos de germinación, inducción, proliferación y regeneración todos los cultivos se mantuvieron en un cuarto de ambiente controlado, a una temperatura de 25°C ± 2°C y con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Las células en suspensión se incubaron en oscuridad a una temperatura de 25°C ± 2°C, se mantuvieron en agitación a 110 rpm.

#### **5.5 Establecimiento de cultivos *in vitro***

Todos los cultivos *in vitro* se trabajaron en campana de flujo laminar utilizando material esterilizado previamente para su manipulación.

##### **5.5.1 Método de desinfección**

El método de desinfección empleado fue el propuesto por Osorio, 2019. Se colocaron semillas de cada variedad en alcohol etílico al 70% con agitación constante durante un minuto, se enjuagaron con agua estéril desionizada. Se

adicionó hipoclorito de sodio 20% con 3 ml/250 ml de solución coloidal de plata y Tween 20 0.5 ml/250 ml durante 1 min, se enjuagaron con agua estéril desionizada. Así mismo se adicionó Agrimicin  $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se mantuvieron en agitación constante durante 10 minutos, las semillas se enjuagaron con agua estéril desionizada. Posteriormente se adicionó Benomil  $4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se mantuvieron con agitación constante durante 10 min. Finalmente se enjuagaron varias veces con agua estéril desionizada.

### 5.6 Germinación de semillas *in vitro*

Las semillas de ambas especies se desinfectaron previamente (punto 5.6.1) y se remojaron en AG<sub>3</sub> ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) durante 24 h previa a la siembra en el medio MG, cuya composición se especifica en la tabla 4, en frascos de vidrio con 100 ml de medio. Se probó el efecto de la ausencia y presencia de BA para la germinación. Se incubaron en las condiciones descritas en el punto 5.4.

**Tabla 4. Composición de medio MG.**

Componente	Concentración (1l)
Sales MS	100%
Vit. MS modificadas	100%
Glicina	2 mg
BA	2 mg
Azúcar	3%
Gelzán	2.5 g

### 5.7 Inducción y proliferación de callo

A partir de las plántulas obtenidas en la sección descrita en punto 5.6 se cortaron secciones de los explantes de hoja y raíz de ambas variedades, en condiciones de asepsia, y se colocaron en frascos con 30 ml de medio correspondiente dependiendo de la variedad, los cuales se muestran en la tabla 5, para promover la inducción del callo.

**Tabla 5. Composición de medio BM y PS.**

Componente	Concentración (1l)	
	BM	PS
Sales MS	100%	
Vit. MS modificadas	100%	
Glicina	2 mg	
BA	2 mg	
2,4-D	1 mg	
Antioxidante	10 ml	
ANA	-	1 mg
AIB	-	1 mg
PVP	1 g	
Azúcar	3%	
Gelzán	2.5 g	

\*ácido ascórbico y ácido cítrico 50 mg/100 ml de cada uno.

Después de 5 semanas se retiró el tejido madre, el material oxidado del callo y se pasó a frascos con medio fresco. El subcultivo del callo de los dos explantes de ambas variedades se realizó cada 5 semanas.

### **5.8 Cinética de crecimiento de callo**

Para la cinética de crecimiento de callo se pesó un gramo y se colocó en frascos con 15 ml de medio correspondiente dependiendo de la variedad, se realizaron cinco repeticiones y se pesó cada segundo día por tres semanas manteniéndolos en las condiciones de incubación descritas en el punto 5.4.

Con estos datos se calcularon los parámetros de índice de crecimiento (IC), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (td) para poder caracterizar el crecimiento.

## **5.9 Células en suspensión**

Se siguió la siguiente metodología para el establecimiento de las células en suspensión.

- a) A partir del callo proliferado de los dos explantes y las dos variedades, se inocularon 4 g de callo en 100 ml de medio correspondiente líquido y se mantuvo en agitación y oscuridad durante dos semanas, los cuales se denominaron cultivos madre.
- b) Se preparó medio líquido, según la variedad que correspondiera y se añadió el agente osmótico (PEG 8000) en concentraciones de 0%, 3% y 6%.
- c) Transcurrido ese tiempo, se filtró el contenido con ayuda de gasas y dispersores celulares para recibirse en medio fresco con PEG en las tres concentraciones descritas anteriormente.
- d) Se realizaron 3 repeticiones con 60 ml cada una, manteniendo las condiciones de agitación de 110 rpm y oscuridad y a una temperatura de 25°C durante dos semanas.

### **5.9.1 Peso fresco y peso seco**

Se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión de cada tratamiento cada segundo día durante dos semanas y se colocó en tubos Eppendorf estériles pesados previamente, se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se retiró el sobrenadante utilizando una jeringa estéril y se volvieron a pesar. Se calculó el peso fresco por diferencia de peso.

Para la determinación de peso seco, se dejaron secar a 25°C hasta alcanzar el peso constante para posteriormente pesarlos y calcular el peso seco por diferencia de peso.

### **5.9.2 Determinación de proteína**

A partir de la toma de alícuotas descrita en el punto 5.9.1, después de retirar el sobrenadante y registrar el peso fresco, se congeló el pellet a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta recolectar las muestras correspondientes a las 2 semanas.

Transcurrido este tiempo, se siguió la siguiente metodología para el análisis del contenido de proteína:

- a) Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente.
- b) Se añadió 500 ml de buffer para lisis a base de urea (605.7 mg Tris base, 48.08 g de urea, 1 g de SDS y agua para 100 ml de solución; pH: 9.5) a cada una de las muestras.
- c) Se aplicó esfuerzo mecánico con pistilos de plástico para promover la ruptura celular.
- d) Se centrifugó 12000 rpm por 10 minutos.
- e) Se tomaron 5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se colocaron en el equipo Bio Drop donde se determinó el contenido de proteína (ng/ $\mu\text{l}$ ) a una longitud de onda de 253 nm.
- f) Con el peso fresco se calculó el contenido de proteína por gramo de peso fresco.

### **5.9.3 Determinación de turbidez**

A partir de la toma de alícuotas descrita en el punto 5.9.1, se congeló la suspensión a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta recolectar las muestras correspondientes a las 2 semanas.

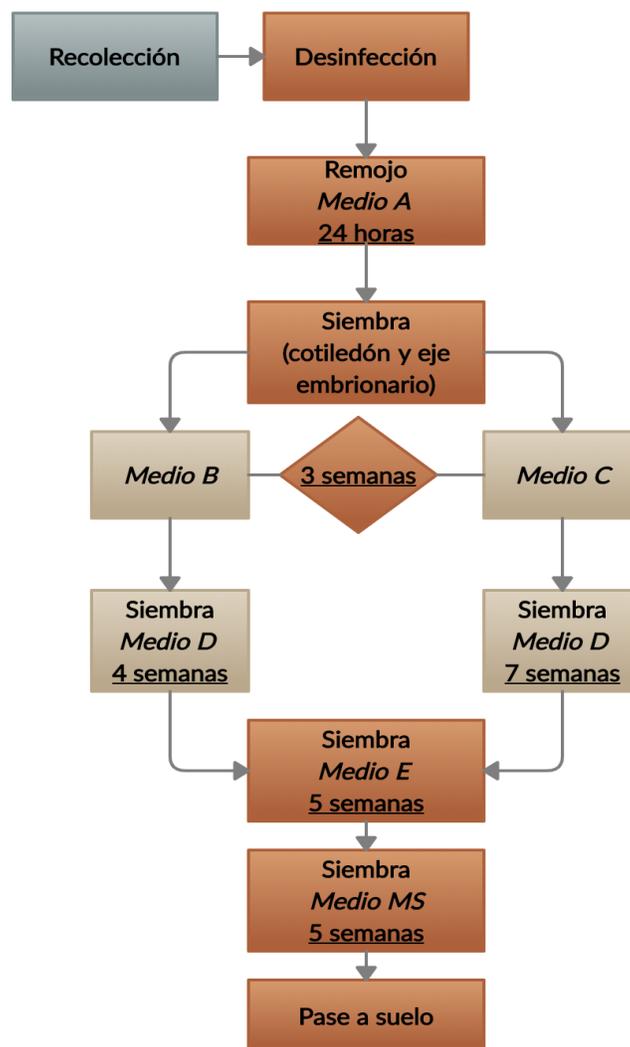
Posteriormente se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se analizaron en el equipo Bio Drop, homogeneizando las muestras al agitar los tubos Eppendorf antes de recolectar 5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y colocar la muestra en el equipo, obteniendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

### 5.9.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los puntos anteriores se utilizaron para construir cinéticas de crecimiento, posteriormente se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (Tukey) utilizando un nivel de significación del  $\alpha=0.05$  utilizando el programa RStudio.

### 5.10 Regeneración

En la figura 9 se muestra la ruta de regeneración que se empleó.



**Figura 9. Ruta propuesta para la regeneración de embriones inmaduros de *Phaseolus vulgaris* L.**

A partir de las plantas germinadas en el punto 5.3, cuando se generaron las vainas, se seleccionaron algunas de distintos tamaños de ambas variedades. Posteriormente se desinfectaron utilizando alcohol etílico al 70% con agitación constante durante un minuto, se enjuagaron con agua estéril desionizada. Se adicionó hipoclorito de sodio 20% y se agitó durante 1 minuto.

Con las vainas desinfectadas, se extrajeron los embriones inmaduros y se dejaron en un remojo en 100 ml del medio A durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron los ejes embrionarios y los cotiledones, los cuales se sembraron una parte en frascos con 30 ml del medio B y otra en frascos con 30 ml del medio C donde se mantuvieron durante 3 semanas.

Debido a que los ejes embrionarios se oxidaron, los cotiledones provenientes del medio B se sembraron en frascos con 30 ml del medio D donde se mantuvieron durante 4 semanas. Los cotiledones provenientes del medio C se sembraron en frascos con 30 ml del medio D donde se mantuvieron durante 7 semanas.

Cuando cumplieron las semanas correspondientes, se subcultivo el material al medio E donde se mantuvieron durante 5 semanas.

Cumpliendo las 5 semanas, se subcultivaron las plántulas formadas a un medio MS sin reguladores para promover la elongación de estas, aquí se mantuvieron durante 5 semanas para, posteriormente, ser pasadas a un sustrato de tierra:agrolita (3:1). La composición de los medios anteriormente mencionados se encuentra en la tabla 6.

**Tabla 6. Composición de medios utilizados para la regeneración de *Phaseolus vulgaris* L.**

Componentes	Medio A	Medio B	Medio C	Medio D	Medio E
Sales MS	100%				
Vit. MS modificadas	100%				
Glicina	2 mg				
BA	-	2.5 mg	-	1 mg	-
AIA	-	0.1 mg	0.05 mg	1 mg	0.1 mg
TDZ	-	-	1 mg	-	-
ANA	-	-	-	-	-
Caseína	-	100 mg			
Azúcar	3%				
Gelzán	-	2.5 g			

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Establecimiento de cultivos *ex vitro*

Se sembraron semillas previamente remojadas durante 24h en AG<sub>3</sub> en macetas conteniendo como sustrato una mezcla de tierra y agrolita en una proporción de 3:1, así como un sistema de hidroponía usando como sustrato sólo agrolita. En cuanto a la germinación se observó que el mayor porcentaje se logró en hidroponía y en la variedad Pinto Saltillo con un 81%, mientras que en las mismas condiciones la variedad Bayo Madero sólo logró el 36% (tabla 7). Cabe recalcar que bajo condiciones de tierra igualmente la variedad de Pinto Saltillo alcanzó un mayor porcentaje, esto indica que la viabilidad de la semilla dependió no sólo de las condiciones en que se germinaron sino también de la variedad.

**Tabla 7. Germinación de *Phaseolus vulgaris* L. en invernadero.**

Germinación invernadero		
	B.M	P.S.
% Germinación con hidroponía	36%	81%
% Germinación en tierra	20%	40%

En la figura 10 se muestra el desarrollo completo de ambas variedades en condiciones de hidroponía posterior a los dos meses de siembra. Se puede observar que ambas variedades son de crecimiento indefinido.

Con el remojo de AG<sub>3</sub> se buscó estimular a las semillas para aumentar el porcentaje de germinación, ya que el ácido giberélico se utiliza principalmente en la elongación de estructuras para acelerar la brotación en ciertos tipos de yemas y meristemas, además estimula la movilidad de reservas de la semilla facilitando la germinación (Contreras, 2016). Se observa que para la variedad de Pinto Saltillo el AG<sub>3</sub> logró estimular la germinación, ya que es la variedad que presentó los porcentajes de germinación más altos en los dos sistemas.

Las semillas germinadas en hidroponía de ambas variedades presentaron un mayor porcentaje de germinación, debido a que este sistema permite:

- Un drenaje del agua de forma más eficiente,
- Mantiene un equilibrio entre el aire, agua y nutrientes,
- La humedad del sustrato permanece uniforme y se evita excesos de agua
- Y hay un mejor control del pH
- Cuando hay un exceso de fertilizante, el sistema permite la lixiviación de las de los mismo, además no hay deficiencia de nutrientes (Zárate, 2014).



**Figura 10. Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de hidroponía.**

Así mismo la solución nutritiva, la cual se aplicó una vez a la semana en el caso del sistema hidropónico y una vez al mes en el de tierra, ayudó al desarrollo de las plantas ya que el N<sub>2</sub> determina la tasa de crecimiento del tejido, el P se utiliza en la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas; el K<sup>+</sup> es necesario para la división celular, síntesis de carbohidratos, regula el pH, y el ambiente osmótico celular; el Ca<sup>2+</sup> es componente principal en las paredes celulares y el Mg<sup>2+</sup> es el elemento central en la porfirina y clorofila (Contreras, 2016).

En el caso del sustrato utilizado como tierra, fue una mezcla de tierra: agrolita (3:1); en ambas variedades la germinación fue menor, siendo para Bayo Madero un 20% contra 36% del sistema de hidroponia y para Pinto 40% contra 81% respectivamente, debido a que el sustrato, aun cuando la mezcla tenía agrolita, al parecer no fue suficiente para eliminar el exceso de agua. Además, el exceso de humedad generó hongos en las semillas, ya que las semillas sembradas en sustrato no se desinfectaron como el caso del sistema de hidroponia en donde se les dio un proceso de desinfección, por otro lado, la solución nutritiva se aplicó con menor regularidad en tierra que en hidroponia, por lo que esta deficiencia de nutrientes en tierra pudo ocasionar esta baja germinación.

Además, no se puede descartar que las semillas tuvieran poca viabilidad ya que fueron proporcionadas en el año de 2017 por el Instituto de Biotecnología. De igual manera se observó que la variedad de Pinto Saltillo tuvo un mayor porcentaje de germinación debido a que es la variedad con resistencia a sequías (Sánchez, 2006).

## **6.2 Germinación *in vitro***

Se sembraron semillas bajo condiciones *in vitro*, previamente desinfectadas como se describe en el punto 5.5.1, en medio MS, con y sin BA como regulador de crecimiento, con la finalidad de determinar si la germinación era dependiente de un regulador exógeno o podía germinar sólo con sus propias reservas.

En la tabla 8 se presenta los porcentajes de germinación de ambas variedades, observándose que Bayo Madero presentó un mayor porcentaje de germinación que Pinto Saltillo en los dos medios de cultivo, observándose que el BA estimuló un

mayor porcentaje de germinación en el caso de Bayo Madero y no así para Pinto Saltillo, por lo que se puede suponer que el BA no tiene efecto en la germinación de esta variedad.

**Tabla 8. Germinación de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones *in vitro*.**

Germinación <i>in vitro</i>				
	B.M		P.S.	
	Con BA	Sin BA	Con BA	Sin BA
<b>% Germinación</b>	80%	60%	20%	20%



**Figura 11. Bayo Madero germinado en condiciones *in vitro*.**

Se puede ver en la figura 11 una plántula obtenida después de dos meses de la variedad Bayo Madero, no obstante que se tuvo una mayor germinación, ésta no fue homogénea, de igual manera se presentó en Pinto Saltillo.

La desinfección se llevó a cabo con el fin de establecer un sistema *in vitro* para el posterior establecimiento de los cultivos celulares de callo. El método de desinfección empleado fue el propuesto por Osorio, 2018 ya que encontró que con este sistema se puede realizar una óptima desinfección puesto que el alcohol etílico

actúa como antiséptico, gracias a su polaridad logra desorganizar la capa lipídica y las proteínas presentes en la membrana de las semillas, además de que se ocasiona una desorganización de la membrana lipídica y desnaturalización de las proteínas de algunos microorganismos (George *et al.*, 2008). El hipoclorito de sodio, al ser un agente oxidante, inactiva las proteínas lo cual afecta desde hongos hasta virus, por lo cual, se debe cuidar la cantidad de reactivo a utilizar, ya que, en exceso,

podría afectar las proteínas de la semilla; al adicionarle la solución coloidal de plata esta reacciona con los grupos SH de las proteínas estructurales de bacterias, como las del metabolismo del oxígeno inhibiendo la respiración celular y por último el Tween 20 actúa como agente surfactante, al disminuir la tensión superficial se facilita la entrada de los demás desinfectantes (George *et al.*, 2008). Posterior a esto, para asegurar la completa asepsia, se añadió el Agrimicin el cual es un bactericida y el fungicida Benomil.

En el caso de Bayo Madero presentó un porcentaje mayor de germinación en presencia de BA ya que este regulador de crecimiento tiene la capacidad de estimular la síntesis de proteínas, participar en el control del ciclo celular, estimular la expansión de las hojas y retardas la senescencia (Contreras, 2016). Sin embargo, para la variedad Pinto Saltillo no presentó diferencias debido a que esta variedad requiere menos humedad para su desarrollo y estando en un medio de cultivo con una alta humedad, las semillas se lograban hinchar, pero sin lograr el desarrollo de las radículas.

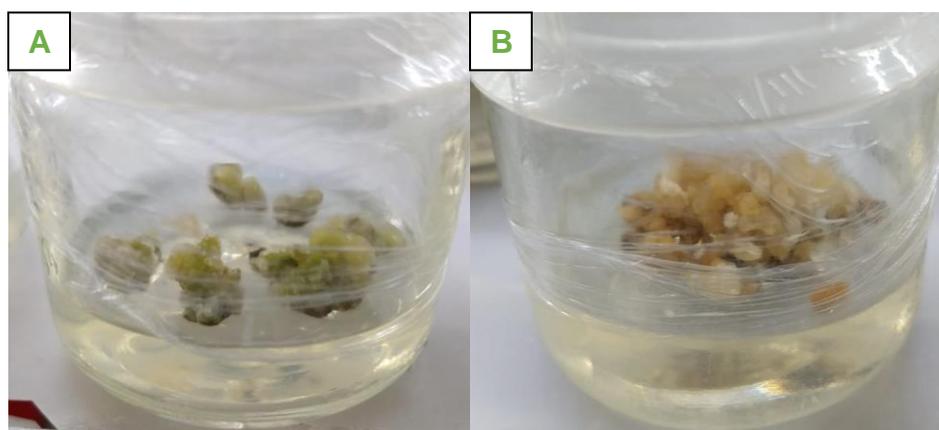
### **6.3 Inducción y proliferación**

Con forme a la metodología establecida por Osorio, 2019, a partir de las plántulas obtenidas en condiciones *in vitro*, se seccionaron partes de hoja y de raíz de ambas variedades para inducir la formación de callo. Los explantes se colocaron en los medios correspondientes conforme a la variedad. En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos de la inducción de callo, en la cual la variedad de Pinto Saltillo presentó un 100% explantes con callo en ambos tipos de tejidos, mientras que Bayo Madero presentó contaminaciones por bacteria provocando un porcentaje menor en los dos explantes, siendo el de raíz el que registró un 25 % solamente.

**Tabla 9. Inducción de formación de callo de explantes de hoja y raíz.**

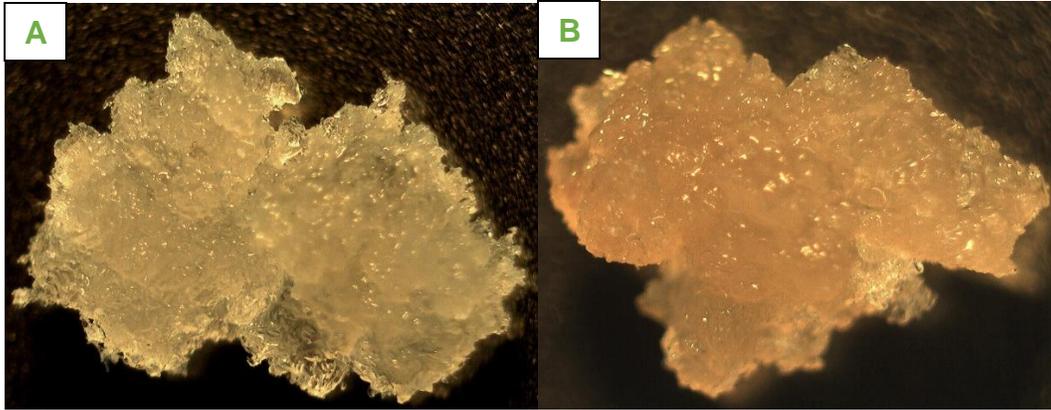
Inducción				
Especie	B.M.		P.S.	
Explante	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
% de Inducción	50	25	100	100

En la figura 12 se observa el callo inducido de los dos explantes, hoja y raíz con tejido madre. Se observa que el callo de hoja aun presenta coloración verdosa debido a los cloroplastos de éstas. Pero en las figuras 11 y 12 se observa que la coloración cambia después de subcultivar el callo, para las dos variedades.



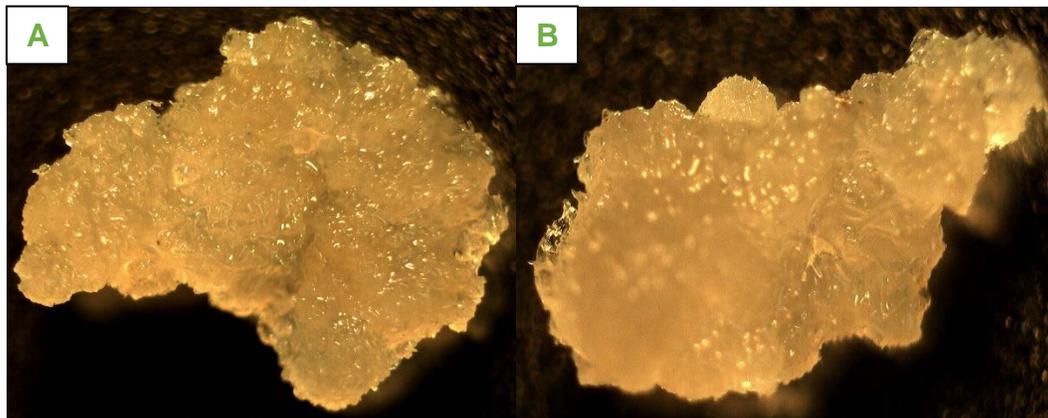
**Figura 12. Inducción de callo de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de dos explantes A: Hoja, B: Raíz.**

Se puede observar el callo de la variedad Bayo Madero en la figura 13. El callo proveniente del explante de raíz es friable, hidratado y claro. Por otro lado, el callo proveniente de hoja es más compacto, de igual manera hidratado y ligeramente opaco.



**Figura 13. Callo de la variedad Bayo Madero A: Raíz, B: Hoja.**

En el caso del callo de la variedad Pinto Saltillo, el cual se muestra en la figura 14, es menos disgregable que el de Bayo Madero para ambos explantes. En el caso de raíz tiene una coloración ligeramente más clara al de la hoja y de igual manera ambos están hidratados.



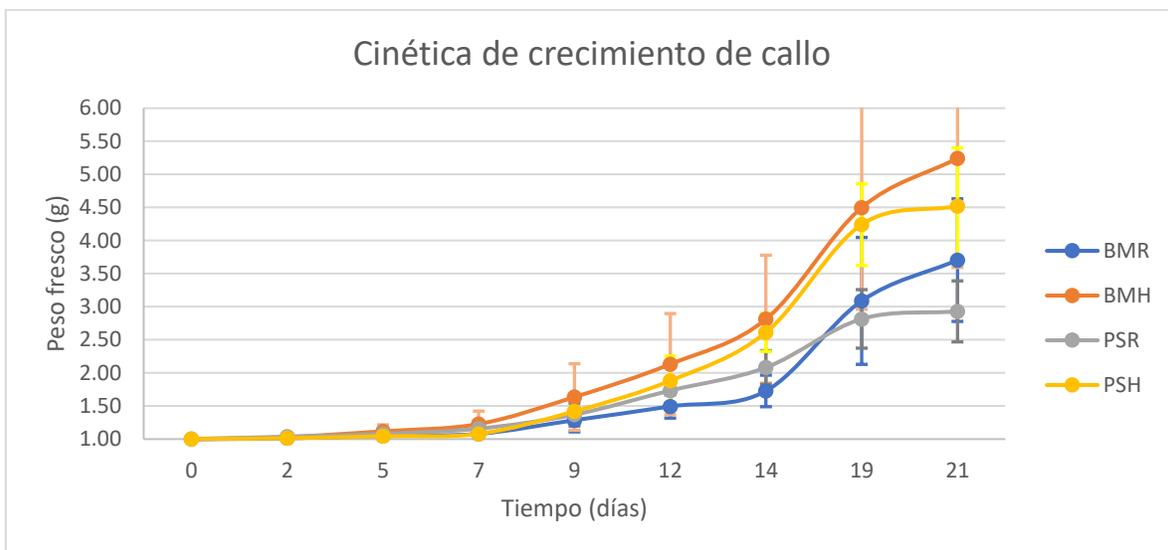
**Figura 14. Callo de la variedad Pinto Saltillo A: Raíz, B: Hoja.**

Debido a que Osorio, 2018 estableció los medios óptimos para la inducción y proliferación del callo para las variedades de Bayo Madero y Pinto Saltillo, la morfología del callo obtenido es similar a la obtenida por Osorio, 2018.

## 6.4 Cinética de crecimiento en callo

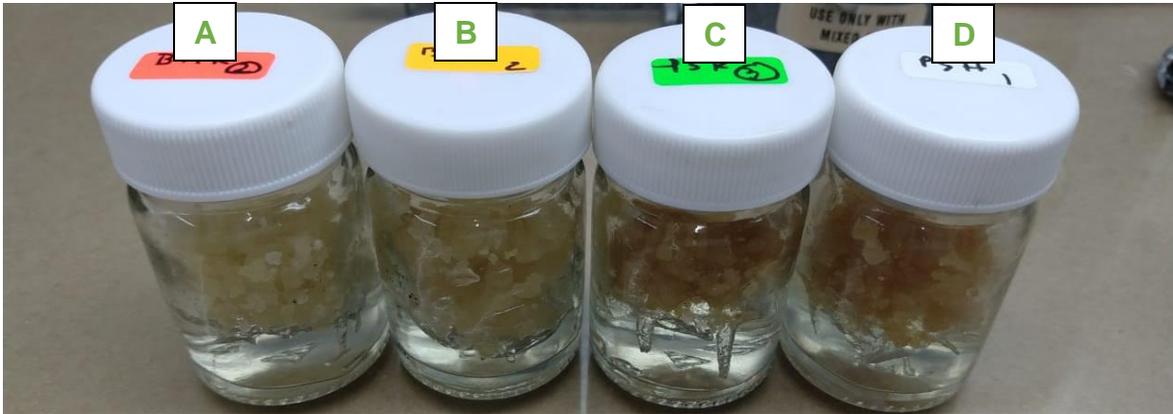
Después de lograr la inducción de callo para cada variedad, se pasó a la proliferación de los mismo y para evaluar y caracterizar su crecimiento se realizó una cinética de peso fresco, la cual se puede observar en el gráfico 3. Pese a que el callo es un tejido desdiferenciado y desorganizado, este tiene una memoria bioquímica, esta será la responsable de que se tengan respuestas diferentes dependiendo del explante y la variedad del cual provienen.

Para las dos variedades, el callo proveniente del explante de hoja mostró un mayor crecimiento a comparación del explante de raíz. Para ambas variedades, y en ambos explantes, la fase exponencial comienza en el día 7 posterior al subcultivo. Para la variedad de Bayo Madero el día 21 se muestra una desaceleración del crecimiento sin llegar aún a la fase estacionaria. En cambio, para la variedad de Pinto Saltillo se observa que en el día 19 comienza esta desaceleración del crecimiento ya que para el día 21 se encuentra en fase estacionaria.



**Gráfico 3. Cinética de crecimiento de callo. BMR: Bayo Madero raíz, BMH: Bayo Madero hoja, PSR: Pinto Saltillo raíz, PSH: Pinto Saltillo hoja.**

En la figura 15 se puede observar los frascos con el callo que se subcultivó para llevar a cabo la cinética de crecimiento.



**Figura 15. Frascos utilizados para la cinética de crecimiento de callo. A: Bayo Madero raíz, B: Bayo Madero hoja, C: Pinto Saltillo raíz, D: Pinto Saltillo hoja.**

En la fase lag, la cual va del día 0 hasta el día 7 para los cuatro casos, se dan una serie de procesos de adaptación al medio. Estos procesos incluyen el incremento de  $\text{NADP}^+$  y ATP, actividad glucolítica, vía de pentosas fosfato, invertasa (la cual se relaciona con la síntesis en pared celular), RNA, y síntesis proteica; ya que en esta fase la capacidad ribosomal es más eficiente (Fowler, 1971, Verma 1974). Para *Phaseolus vulgaris*, los subcultivos estimulan la formación e incremento de polisomas y la transcripción de RNAm, este incremento es dependiente del 2,4-D y ANA (Bevan y Northecote, 1981).

En la fase exponencial que va del día 7 al día 21 para la variedad de Bayo Madero y del día 7 al 19 para Pinto Saltillo, se presenta un decremento en el tamaño celular debido a que, gracias a la constante multiplicación celular, se da un incremento en el peso fresco, el cual está relacionado con el número de células, así como el contenido de agua dentro de estas (Bevan y Northecote, 1981).

En la fase estacionaria, la cual se presenta para la variedad de Pinto Saltillo, a partir del día 19, el peso seco, el cual esta relacionado con el número de células presentes, disminuye, ya que el cultivo alcanza su máxima densidad celular, por lo cual las células permanecen viables, pero se detiene la división (Villacencio, 2002).

Debido a que Pinto Saltillo es la variedad resistente a sequía (Sánchez I. *et al*, 2006), es en la que se observa el inicio de la fase estacionaria, ya que una alta humedad

afecta el crecimiento de esta variedad, mientras que, para Bayo Madero, esta humedad favorece su desarrollo, lo que se ve reflejado al día 21, que continua en fase exponencial.

Los explantes de raíz son los que muestran un menor crecimiento debido a que es el órgano encargado de la absorción de agua, por lo cual el déficit de nutrientes que se presenta en la fase exponencial afecta el incremento de peso de este explante más que el de hoja.

A partir de la cinética obtenida, se calcularon los parámetros de crecimiento mostrados en la tabla 10.

**Tabla 10. Parámetros de crecimiento obtenidos a partir de la cinética de crecimiento de callo.**

Parámetros de crecimiento				
Variedad	Explante	IC	$\mu$ (g·d <sup>-1</sup> )	td (d)
Bayo	Raíz	1.880	0.088	7.863
Madero	Hoja	2.204	0.097	7.143
Pinto	Raíz	1.055	0.072	9.620
Saltillo	Hoja	1.987	0.109	6.334

IC= índice de crecimiento,  $\mu$  = velocidad específica de crecimiento, Td= tiempo de duplicación

Se reafirma lo observado en el gráfico 3 ya que la variedad Bayo Madero presenta un mayor índice de crecimiento al de Pinto Saltillo si se compara cada explante respectivamente. Esto se debe a que en el medio utilizado, pese a que se reporte que la sacarosa es responsable de 4/5 del potencial osmótico final en el medio, la hidrólisis causada en la esterilización hace que estos azúcares estén disponibles como fuente de carbono y el potencial que cada monosacárido contribuye es menor (George y Sherrington,1984), por lo cual no existe un agente que modifique drásticamente el potencial osmótico lo que ocasiona que el agua en el medio tenga una mayor disponibilidad por lo que se favorece el desarrollo de Bayo Madero. De igual manera, en ambas especies la hoja es la que tiene un mayor índice respecto a la raíz.

Por otro lado, el tiempo de duplicación para Bayo Madero en hoja es mayor al de raíz, lo cual indica que, pese a que el explante de hoja gana más gramos al día ( $\mu$ ), las células se dividen con menor rapidez que en la raíz. Esto indica que el explante de hoja obtiene su peso del agua del medio, lo cual se refleja en la apariencia hidratada del callo.

Para Pinto Saltillo, el explante de raíz tiene un tiempo de duplicación mayor y la ganancia de peso por día es menor, esto indica que el explante requiere un mayor tiempo para adaptarse al exceso de agua en el medio, ya que en el apartado de germinación 6.1 se observa que Pinto Saltillo se beneficia con la deficiencia de agua. En cuanto al explante de hoja, el tiempo de duplicación es menor y su ganancia de peso mayor, por lo cual este explante tiene un mayor crecimiento respecto al de Bayo Madero. La diferencia en el índice de crecimiento recae en que el explante de hoja de Pinto Saltillo no introduce tanta agua a sus células como el de Bayo Madero, esto se ve reflejado en que este gana menos gramos al día que Pinto Saltillo

### **6.5 Evaluación del crecimiento bajo condiciones de estrés osmótico en células en suspensión**

Una vez determinadas las fases de crecimiento para los callos, a partir del día 7 se inocularon los ensayos de células en suspensión. En la figura 16 se observan los cultivos madre ya establecidos para realizar los experimentos con el agente osmótico, donde se establecieron tres concentraciones, 0% el cual fue el control, 3% y 6% de PEG 8000. A partir de éstos se determinaron los parámetros de Peso Fresco, Peso Seco, Proteína y Turbidez para caracterizar el crecimiento de los explantes bajo condiciones de estrés. A cada cinética de crecimiento se le realizó un análisis estadístico para conocer si existe una diferencia significativa entre las concentraciones empleadas, dicha prueba fue una prueba de Tukey para agrupar los tratamientos, donde los tratamientos con la misma letra no presentan una diferencia significativa.

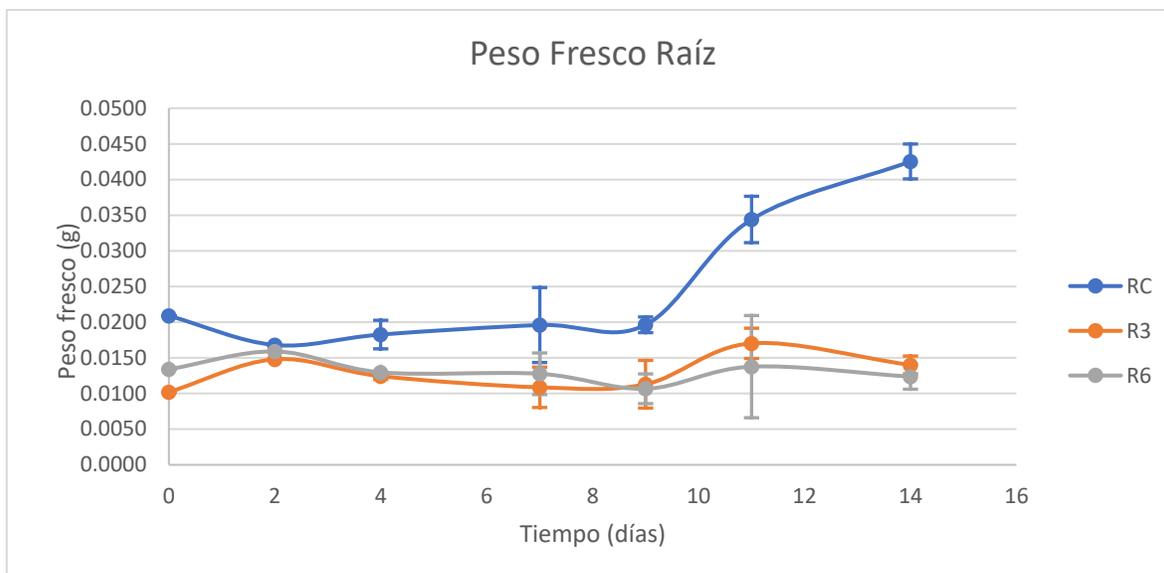


**Figura 16. Establecimiento de cultivos madre en células en suspensión.**

### **6.5.1 Peso Fresco**

A partir de los cultivos madre se tomaron alícuotas para realizar las cinéticas de crecimiento. Una vez eliminando el medio de cultivo de la alícuota, se determinó el peso del paquete celular para construir las cinéticas de peso fresco.

En el gráfico 4 se puede observar la cinética correspondiente a la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz, en el caso del control se observa un incremento constante a partir del día 9, mientras que con el 3% y 6% el crecimiento no es tan considerable como en el control y se abate al día 11 en ambos casos.



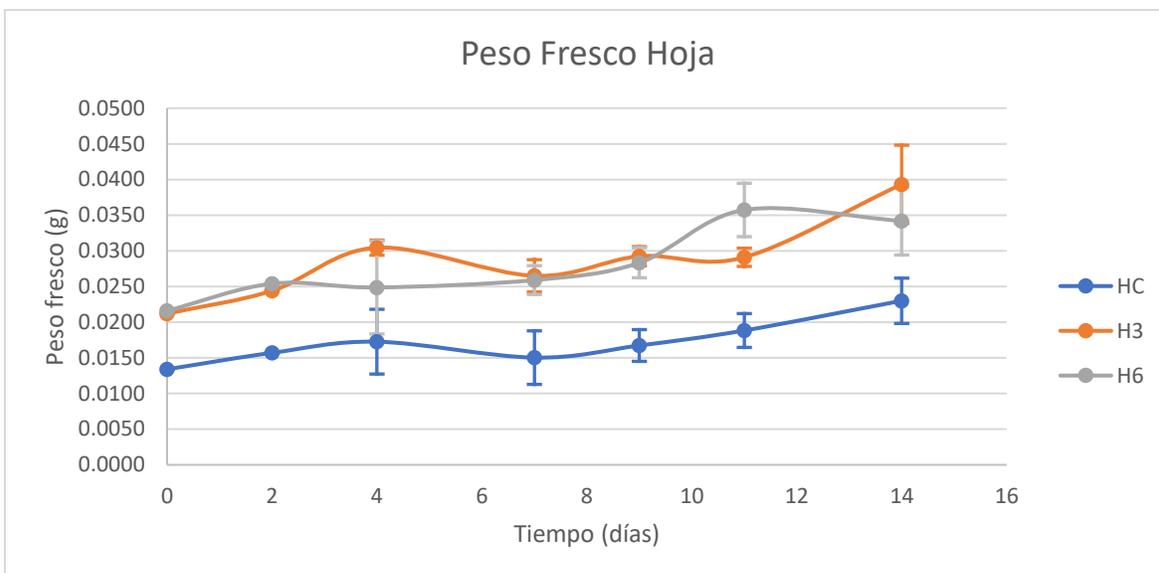
**Gráfico 4. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando raíz como explante para peso fresco.**

El análisis estadístico (tabla 11) muestra que existe una diferencia significativa entre el control y las concentraciones de 3% y 6%. Lo cual sugiere que el explante de raíz de la variedad de Bayo es susceptible al estrés hídrico, ya que se registra un menor incremento de peso.

**Tabla 11. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0245 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0129 <sup>b</sup>
Concentración 6%	0.0131 <sup>b</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0081

En el caso de la hoja, se observa en el gráfico 5 que el control mantiene un crecimiento constante a partir del día 7, para las concentraciones de 3% y 6% también se observa un crecimiento, incluso mayor al del control, además que en el caso de 3% el crecimiento se da de manera constante a partir del día 11, contrario al 6% donde éste es el día en el que comienza el abatimiento del peso.



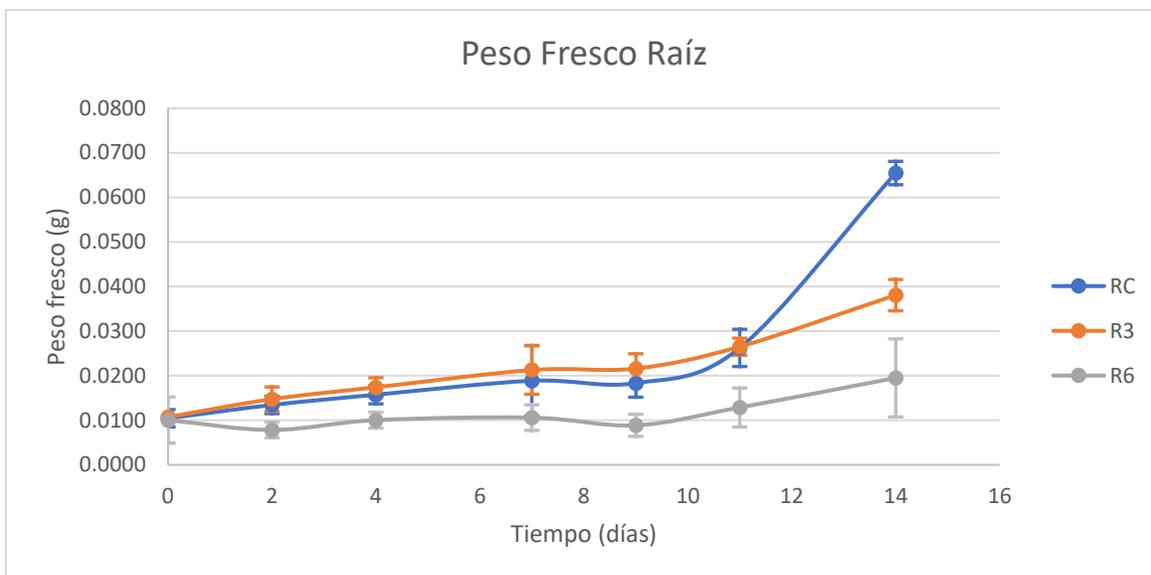
**Gráfico 5. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando hoja como explante para peso fresco.**

De acuerdo con lo mostrado en la tabla 12, existe una diferencia significativa entre el control y las concentraciones de 3% y 6%, pero en este caso se observó un incremento de peso respecto al control. Esto puede indicar que el explante de hoja, al estar bajo un estrés hídrico, ingresa una mayor cantidad de agua a las células como mecanismo de defensa.

**Tabla 12. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0171 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0286 <sup>b</sup>
Concentración 6%	0.0280 <sup>b</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0065

Para la variedad de Pinto Saltillo, en el gráfico 6 se observa la cinética correspondiente al explante de raíz. En este se observa en los 3 casos que existe un crecimiento constante del peso, pero este crecimiento es mayor en el control a partir del día 9, seguido del 3% y el menor crecimiento con el 6% sin lograr abatirse en ninguno de los 3 tratamientos.



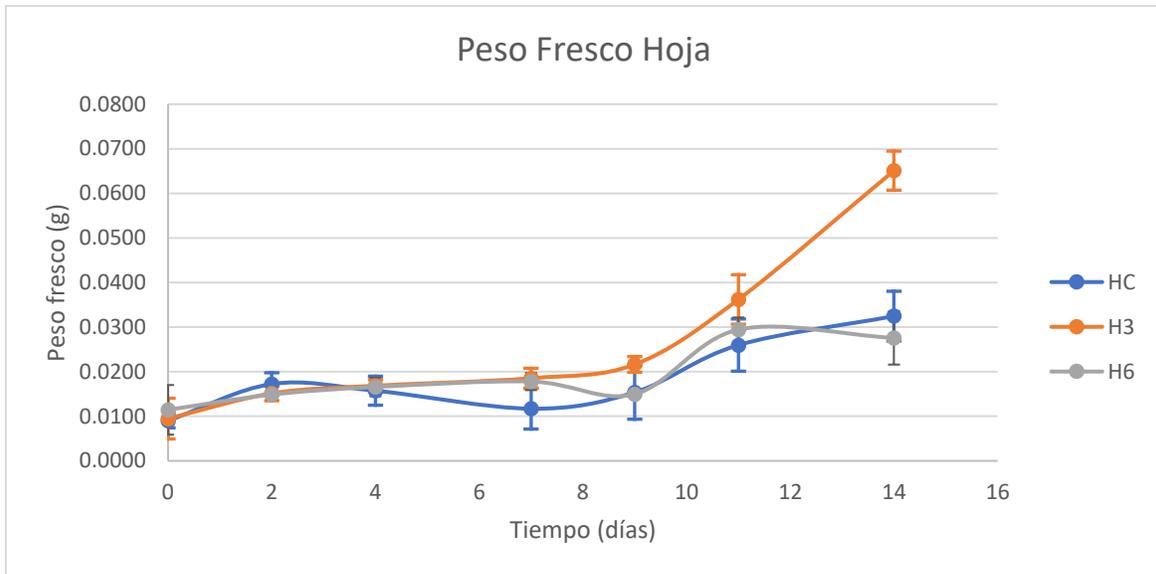
**Gráfico 6. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando raíz como explante para peso fresco.**

Para la variedad de Pinto saltillo, el explante de raíz muestra que no hay diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 3% y 6% (tabla 13), con lo cual se confirma que esta variedad es resistente a sequias.

**Tabla 13. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0241 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0215 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0114 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0167

Para el caso del explante de Hoja, en el gráfico 7 se observa que el mayor crecimiento se da con la concentración de 3% a partir del día 9 donde comienza el aumento constante, mientras que el control, aunque mantiene un aumento, este es menor. Por otro lado, el de 6% es el que muestra menor crecimiento y a partir de día 11 se observa el abatimiento del aumento de peso.



**Gráfico 7. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando hoja como explante para peso fresco.**

De igual manera para el explante de hoja, el análisis estadístico (tabla 14) muestra que no existe diferencia significativa entre el control y los tratamientos. Pese a que la concentración de 3% tiene un mayor crecimiento, esto puede deberse a que la variedad de Pinto Saltillo requiere una menor humedad para su desarrollo, por lo que disminuir la disponibilidad de agua con el PEG estimula su crecimiento.

**Tabla 14. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso fresco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.**

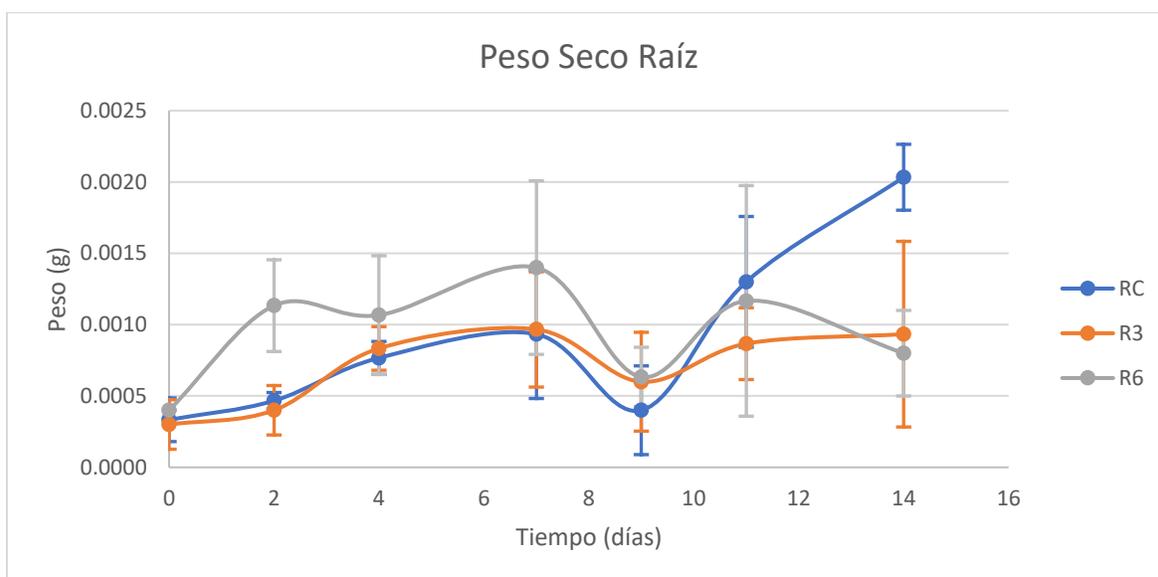
Concentraciones	Grupos
Control	0.0182 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0261 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0189 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0172

### 6.5.2 Peso Seco

Después de tomar los datos correspondientes a las cinéticas de peso fresco, los Eppendorf que contenían el paquete celular se dejaron secar a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, posteriormente se pesaron para obtener

las cuatro cinéticas de peso seco, correspondientes a las dos variedades con los dos explantes.

Para la variedad Bayo Madero, en el explante de raíz se observa en el gráfico 8 que en los 3 casos se presenta el mismo comportamiento, donde hay un decremento de peso en el día 9, posterior a esto, el control es el que muestra un mayor incremento de peso, seguido del 3% y el de 6% donde, pese a que en los primeros días es el tratamiento donde más peso se gana, se observa un decremento del peso en el día 9 y a partir del día 11.



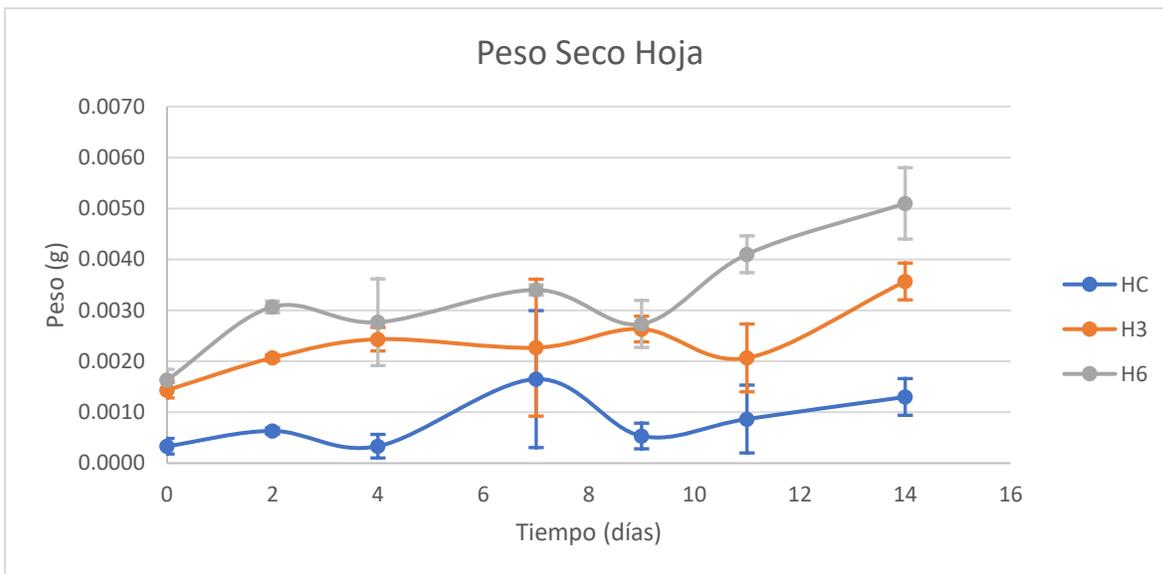
**Gráfico 8. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando raíz como explante para peso seco.**

Para la variedad de Bayo Madero, contrario a lo obtenido en el parámetro de peso fresco, para el peso seco no se encontraron diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 3% y 6% (tabla 15). Esto indica que el crecimiento de las células no es significativamente diferente cuando son sometidas a estrés, lo cual nos sugiere que tiene un mecanismo de defensa al estrés diferente al del explante de hoja, el cual puede estar relacionado con la expulsión de agua de la célula.

**Tabla 15. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0009 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0007 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0009 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0006

Para el explante de hoja se observa en el gráfico 9 que el control es el que menor incremento de peso muestra, seguido del 3% donde a partir del día 11 tiene un crecimiento constante, y el que muestra el mayor incremento es el de 6% ya que desde el día 9 se presente este incremento constante del peso.



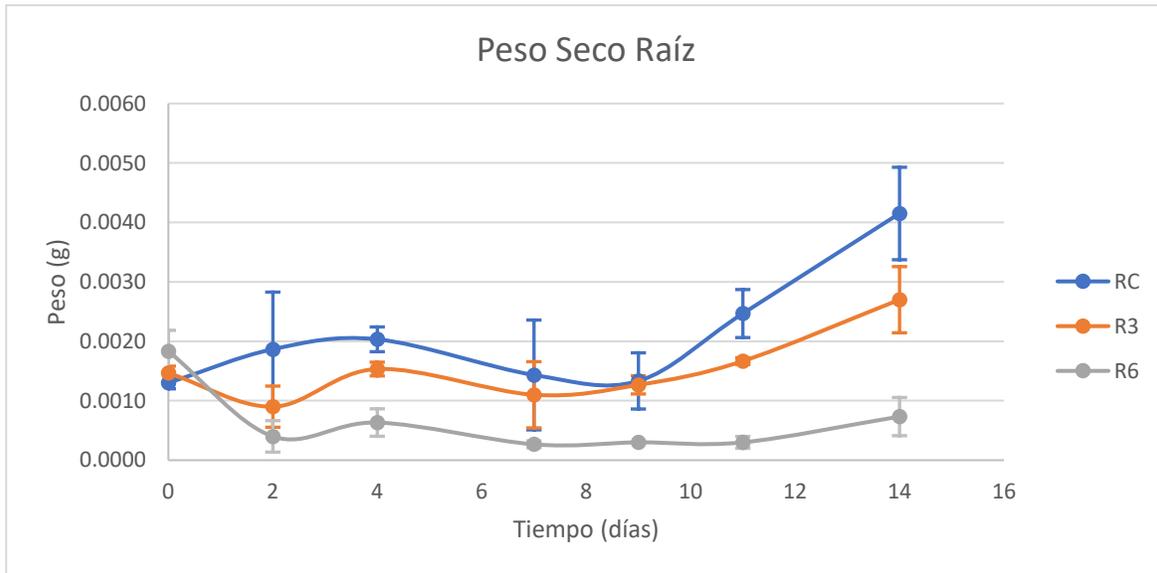
**Gráfico 9. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Bayo Madero utilizando hoja como explante para peso seco.**

De igual manera, no hay diferencias significativas para el explante de hoja, como se observa en la tabla 16. Contrario a lo que sucede con la raíz, pero de igual manera que con el peso fresco, existe un incremento de peso cuando se añade el PEG, sin llegar a ser significativo.

**Tabla 16. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0008 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0023 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0032 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0011

Para la variedad de Pinto Saltillo, la cinética correspondiente al explante de raíz se muestra en el gráfico 10 donde el mayor incremento de peso se presenta en el control a partir del día 9, seguido del 3% que prácticamente mantiene el peso inicial y seguido del 6% que registró una pérdida de peso al finalizar la cinética.



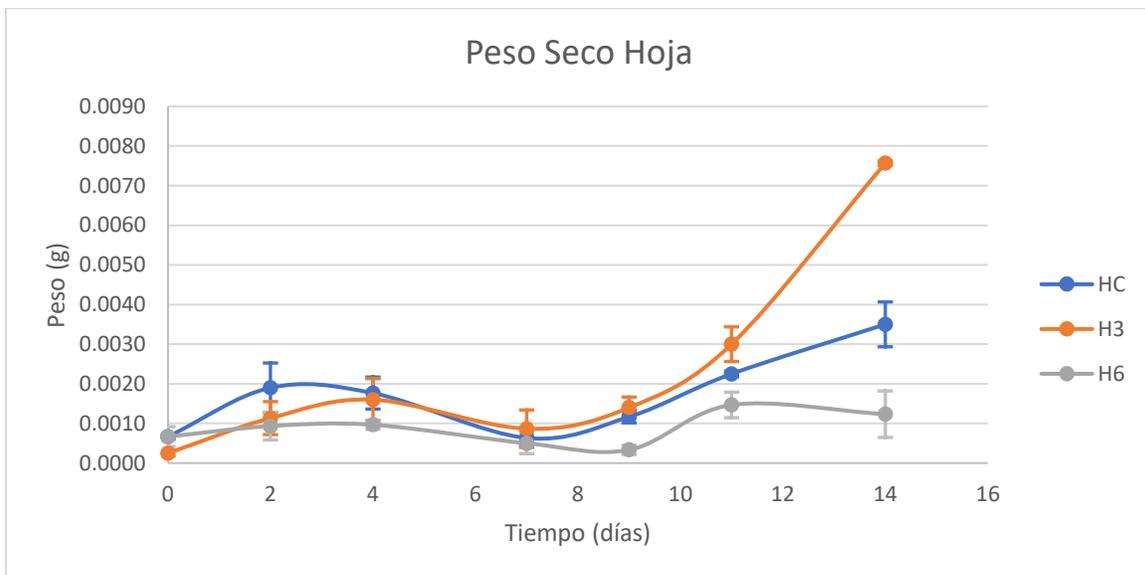
**Gráfico 10. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando raíz como explante para peso seco.**

En el análisis estadístico, la tabla 17 indica que se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Donde el control no es significativamente a la concentración de 3% y esta a su vez tampoco tiene diferencias significativas con la concentración de 6%.

**Tabla 17. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0021 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0015 <sup>ab</sup>
Concentración 6%	0.0006 <sup>b</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0014

Para el explante de hoja se ve en el gráfico 11 que en la concentración de 3% se observa el mayor incremento de peso, el cual comienza a partir del día 7, seguido del control el cual muestra la misma tendencia, pero sin llegar a alcanzar el peso del 3%. En el caso del 6% el día 9 se observa un ligero incremento del peso, pero este se abate al día 11 donde comienza la pérdida de peso.



**Gráfico 11. Cinética de crecimiento de células en suspensión de Pinto Saltillo utilizando hoja como explante para peso seco.**

A diferencia del explante de raíz, el explante de hoja no muestra diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 3% y 6% como se observa en la tabla 18. Además, se observa la misma tendencia que en el parámetro de peso fresco, donde el explante tiene un mayor crecimiento con la concentración de 3%.

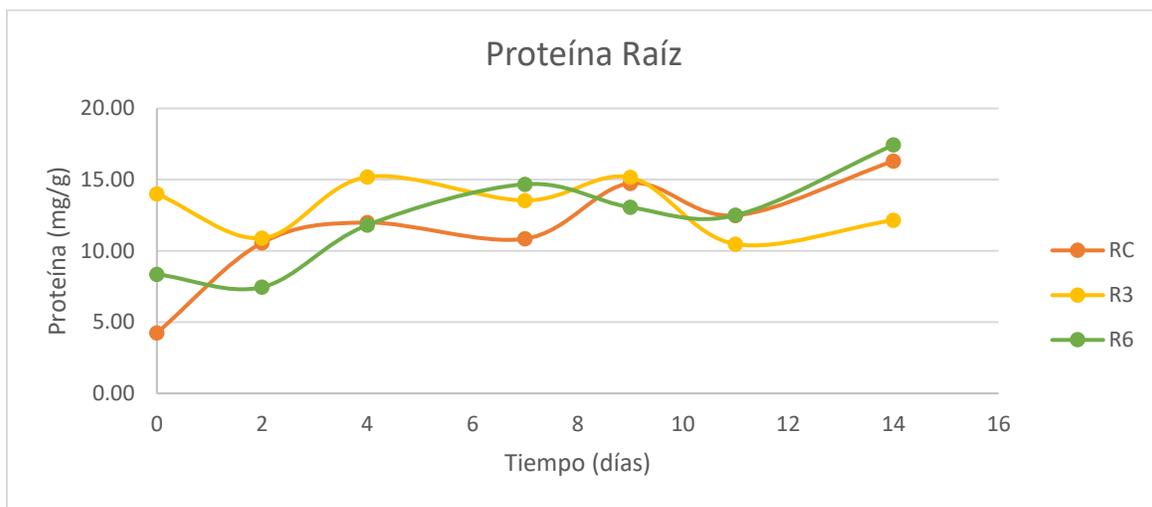
**Tabla 18. Prueba de Tukey para el parámetro de Peso seco para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0017 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0022 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0009 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0021

### 6.5.3 Contenido proteínico

A partir de las alícuotas tomadas de los cultivos madre, se determinó el contenido de proteína. En los gráficos obtenidas se muestra el contenido de proteína en miligramos de proteína por gramo de callo.

En el gráfico 12 se muestra el explante de raíz para la variedad de Bayo Madero, se puede observar que los tres tratamientos presentan un patrón de comportamiento bastante similar, donde se tienen incrementos y decrementos del contenido de proteína, pero a partir del día 11 se ve un incremento constante en el contenido proteico.



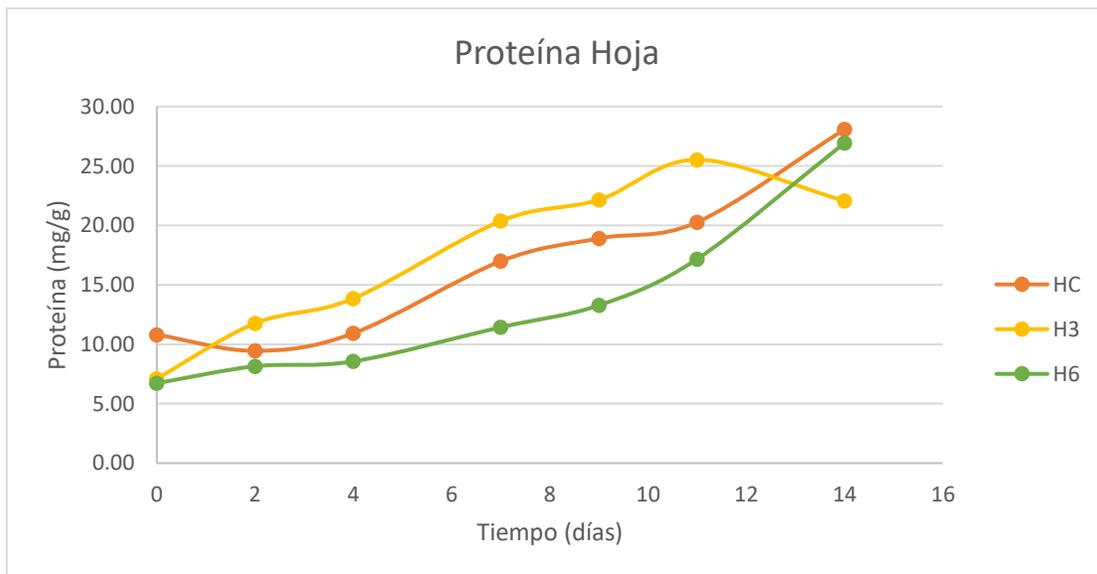
**Gráfico 12. Contenido de proteína del explante de raíz para Bayo Madero.**

Como se observa en la tabla 19, no se presentó diferencia significativa entre los grupos, contrario a lo obtenido en los parámetros de peso fresco y seco.

**Tabla 19. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	11.60 <sup>a</sup>
Concentración 3%	13.06 <sup>a</sup>
Concentración 6%	12.18 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	4.344

De igual manera para el explante de hoja, el cual se puede ver en el gráfico 13 se ve un comportamiento similar en los tratamientos, con la diferencia que para la concentración de 3% a partir del día 11 se ve un decaimiento del contenido de proteína, mientras que en el control y en el 6% este continúa aumentando.



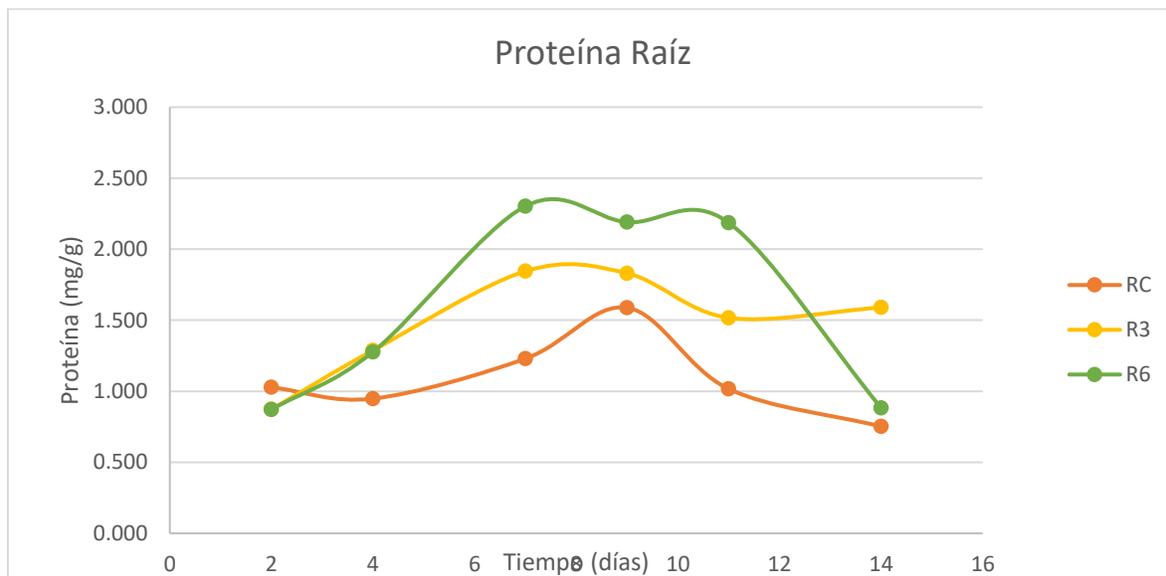
**Gráfico 13. Contenido de proteína del explante de hoja para Bayo Madero.**

Al igual que en el explante de raíz, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 20), por lo cual este parámetro no es fiable para monitorear el crecimiento de la variedad de Bayo Madero.

**Tabla 20. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	16.49 <sup>a</sup>
Concentración 3%	17.55 <sup>a</sup>
Concentración 6%	13.18 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	9.282

Para la variedad de Pinto Saltillo, el explante de raíz muestra un comportamiento diferente al de Bayo, aunque de igual manera similar entre los tratamientos, como se puede observar en el gráfico 14, cabe resaltar que el único tratamiento que muestra un incremento al final de la cinética es el de 3%, ya que el control y el 6% muestran un decremento, pese a que el 6% muestre el mayor incremento de los 3 desde el día 7, pero a partir del día 11 este contenido proteico decae. El control igual tiene un aumento teniendo su pico en el día 9 pero decae a partir de éste.



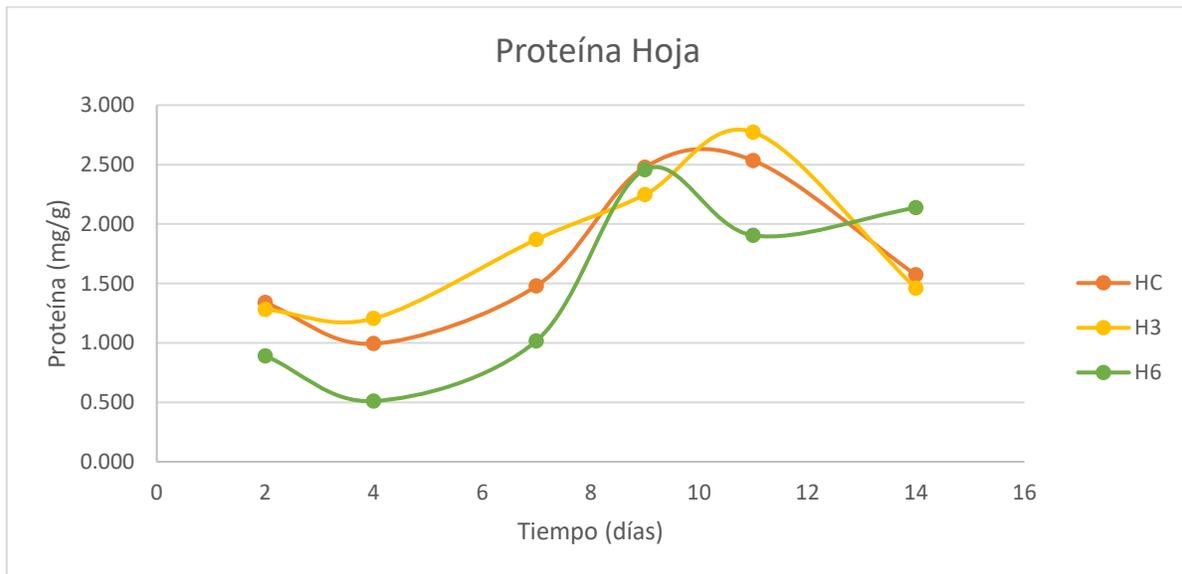
**Gráfico 14. Contenido de proteína del explante de raíz para Pinto Saltillo.**

En la tabla 21 se muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

**Tabla 21. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	1.094 <sup>a</sup>
Concentración 3%	1.491 <sup>a</sup>
Concentración 6%	1.619 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.7160

De igual manera para la hoja, como se observa en el gráfico 15 los tratamientos muestran un comportamiento similar entre ellos, donde hay un decaimiento del contenido proteico entre los días 2 a 6 y, a partir de este, aumenta la proteína para el control, donde la mayor cantidad se registró en el día 10. Para el 3% el pico se registró en el día 11 y para el 6% desde el 9, pero este es el único tratamiento que muestra un incremento posterior, en el día 11, ya que el control y el 3% comienzan a decaer a partir de su máxima concentración.



**Gráfico 15. Contenido de proteína del explante de hoja para Pinto Saltillo.**

Al igual que en los parámetros de peso fresco y peso seco, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 22).

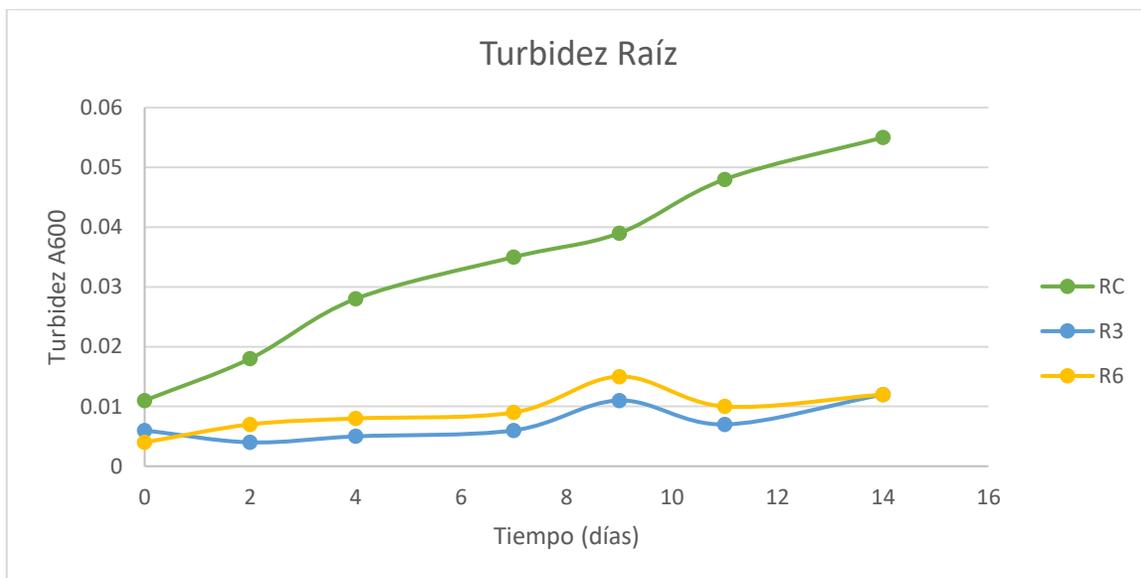
**Tabla 22. Prueba de Tukey para el parámetro de Proteína para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	1.733 <sup>a</sup>
Concentración 3%	1.806 <sup>a</sup>
Concentración 6%	1.486 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	1.020

### 6.5.4 Turbidez

Además de realizarse las determinaciones de proteína, se determinó la turbidez de las alícuotas.

Para la variedad de Bayo Madero, el explante de raíz muestra en el gráfico 16 que el control tiene un crecimiento constante durante las determinaciones, por otro lado, tanto el 3% como el 6% prácticamente no muestran incremento durante la cinética, sólo un ligero aumento en el día 9.



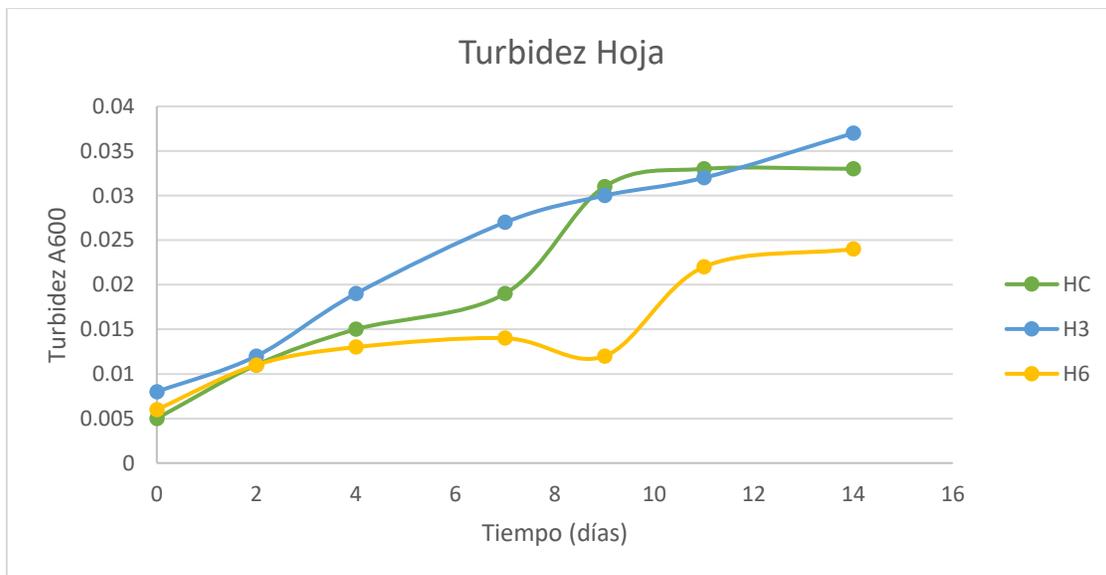
**Grafica 16. Turbidez en células en suspensión del explante de raíz para Bayo Madero.**

El análisis estadístico (tabla 23) indica que existe una diferencia significativa entre el control y las concentraciones de 3% y 6%, lo cual coincide con lo obtenido en el parámetro de peso fresco.

**Tabla 23. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0334 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0073 <sup>b</sup>
Concentración 6%	0.0093 <sup>b</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0129

Para el caso de la hoja, se puede observar en el gráfico 17 que el 3% muestra un incremento constante durante los días, por otro lado, el control y el 6% muestran un incremento más marcado entre los días 7 y 10 pero después se puede observar que mantienen una turbidez constante, donde la turbidez del 6% es menor a la del control.



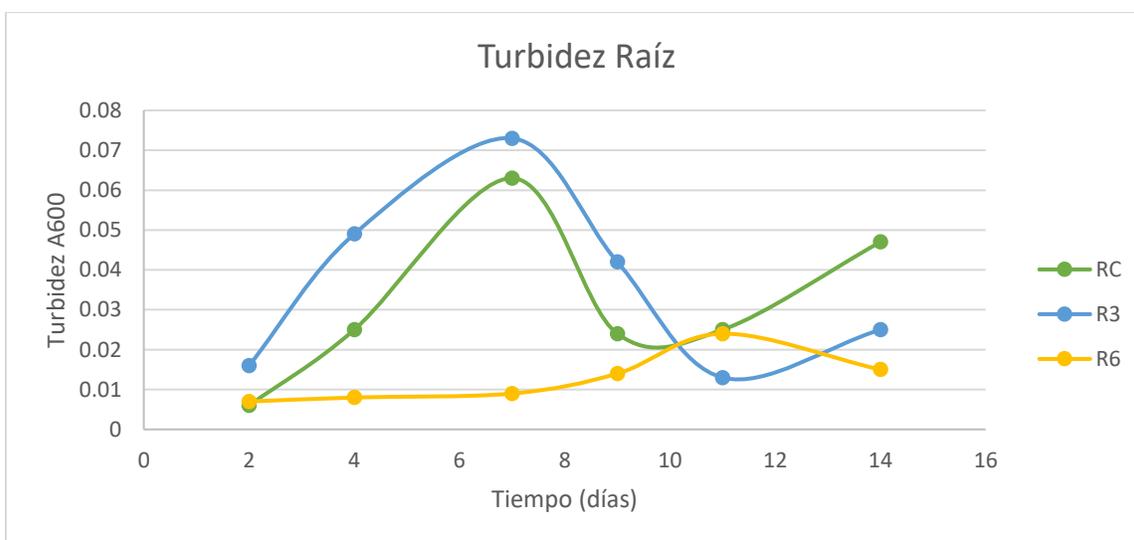
**Gráfico 17. Turbidez en células en suspensión del explante de hoja para Bayo Madero.**

Para la hoja, se encontraron diferencias significativas entre el control y las concentraciones de 3% y 6%, al igual que con el explante de raíz, estas diferencias concuerdan con el parámetro de peso fresco (Tabla 24).

**Tabla 24. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Bayo Madero utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0210 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0236 <sup>b</sup>
Concentración 6%	0.0146 <sup>b</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0133

Para la variedad de Pinto Saltillo el control y el 3% muestran un comportamiento similar, como se observa en el gráfico 18, donde la mayor turbidez registrada es el día 7, posteriormente ambas disminuyen y entre los días 8 y 11 se muestra nuevamente un incremento constante de la turbidez. En cambio, el 6% se muestra prácticamente constante con un ligero incremento el día 11.



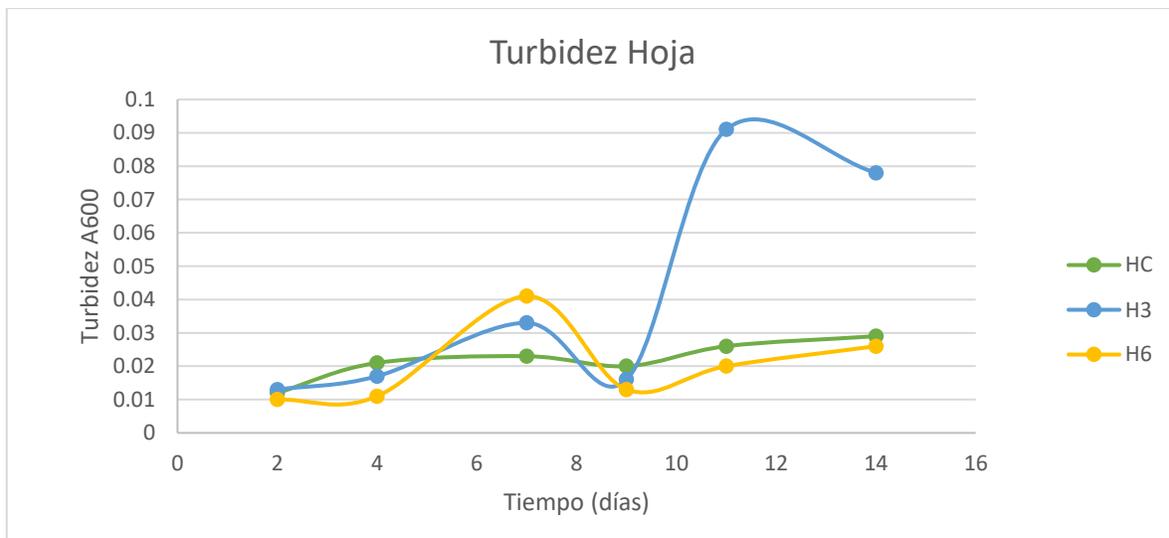
**Gráfico 18. Turbidez en células en suspensión del explante de raíz de Pinto Saltillo.**

Pese a la cinética obtenida, el análisis estadístico (tabla 25) indica que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos.

**Tabla 25. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de raíz.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0317 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0363 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0128 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0270

Para el caso de la hoja el control se mantiene prácticamente constante sin crecimiento, como se muestra en el gráfico 19, el 6% muestra un incremento en el día 7, pero posteriormente decae y se mantiene constante, en cambio el 3% igual muestra este pequeño incremento el mismo día, pero al día 11 se registra un incremento más pronunciado de la turbidez.



**Gráfico 19. Turbidez en células en suspensión del explante de hoja para Pinto Saltillo.**

Al igual que con el explante de raíz, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 26).

**Tabla 26. Prueba de Tukey para el parámetro de Turbidez para la variedad de Pinto Saltillo utilizando el explante de hoja.**

Concentraciones	Grupos
Control	0.0218 <sup>a</sup>
Concentración 3%	0.0413 <sup>a</sup>
Concentración 6%	0.0202 <sup>a</sup>
Diferencia significativa mínima	0.0319

En todos los casos, la determinación de proteína no mostró una diferencia significativa entre los tratamientos, esto contradice a lo reportado por Rosabal, *et al.*, 2014, lo cual indica que, bajo condiciones de estrés disminuye la síntesis de proteínas, pero se incrementa la producción de prolina. Por esta razón, se esperaba ver diferencia significativa entre el control y los tratamientos, esto indica que el tamaño de muestra no es adecuado para lograr determinar las diferencias significativas entre el control y los tratamientos, por lo tanto, con esta metodología, la determinación de proteína empleada no es fiable para monitorear la respuesta al estrés de las variedades Bayo Madero y Pinto Saltillo en células en suspensión.

Para la variedad de Bayo Madero, los dos explantes mostraron las mismas respuestas en el análisis estadístico, donde se presenta una diferencia significativa entre el control y las concentraciones de 3% y 6% en los parámetros de peso fresco y turbidez, pero sin diferencias en peso seco y proteína. En el explante de raíz para el peso fresco (gráfico 4) el incremento de peso en las concentraciones de 3% y 6% es menor, debido al alto potencial osmótico; la misma tendencia se observa para el peso seco (gráfico 8) pero en este parámetro no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, esto indica que el explante puede crecer bajo condiciones de estrés pero el contenido de agua dentro del tejido celular disminuye conforme incrementa la concentración de PEG, este es un efecto similar a lo que ocurre cuando se incrementa el contenido de sacarosa en un medio de cultivo, ya que George, *et al.*, 2008 reporta que el contenido de agua en los tejidos disminuye cuando el de sacarosa aumenta, además que el peso seco aumenta conforme incrementa la concentración de sacarosa, esto se debe a que a altas

concentraciones la sacarosa actúa como un agente osmótico. Este mecanismo de respuesta se ve reflejado también en los otros dos parámetros, ya que el contenido de proteína tampoco muestra diferencia significativa, lo cual indica que en los tres casos el explante trata de adaptarse al medio de cultivo. Por otro lado, el parámetro de turbidez indica que existe menor cuenta celular en las concentraciones de 3% y 6%, ya que, al ser tejidos con un menor contenido de agua, no logran formar agregados celulares como en el caso del control, lo que conlleva a que la turbidez del medio no aumente. Esto concuerda también con lo reportado con Mohhamed y *et al* (2008) ya que indican que el callo de raíz de *Phaseolus acutifolius* y de *Phaseolus vulgaris* L. incrementa su peso seco cuando se pone bajo condiciones de estrés hídrico inducido con PEG 10000. En condiciones de invernadero, *Phaseolus acutifolius* aumenta la longitud de la raíz, esto se ve reflejado en el incremento de peso seco, ya que el explante incrementa su tamaño para la búsqueda de agua y nutrientes. Pese a que el explante muestre un mecanismo de respuesta, el decremento de peso confirma que esta variedad es susceptible a sequías.

Para el explante de hoja se observa la misma tendencia en los análisis estadísticos, donde para peso fresco y turbidez existe una diferencia significativa, pero para proteína y peso seco no. Contrario a la raíz, en el peso fresco y en el peso seco existe una diferencia porque el peso de las concentraciones 3% y 6% es mayor a la del control, lo cual indica que las células tienen un mayor crecimiento bajo un potencial osmótico alto y su contenido de agua también aumenta. Esto indica que el mecanismo contra el estrés de este explante es diferente al de raíz ya que se observa el efecto de la expansión foliar, donde las hojas aumentan su tamaño para llegar a una homeostasis, la cual le permita una mayor apertura de estomas (Rosabal, *et al.*, 2014), esto concuerda con lo obtenido en la cinética de crecimiento de callo, ya que este explante es el que presenta el mayor índice de crecimiento, debido al ingreso de agua a las células. Pese a que Caemmerer S. y Farquhar G., 1984 reportan que en las hojas existe una defoliación parcial lo cual causa un incremento en asimilación de CO<sub>2</sub>, con el estrés prolongado también se da el

decremento en la regeneración de Ruby en la variedad de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Hawkesbury Wonder. Este mecanismo se presenta cuando el estrés se da de manera prolongada, por lo que se asume que, al ser un explante que tiene poco tiempo de exposición al estrés, la respuesta inicial es promover el ingreso de agua a las células y el crecimiento celular. Además, la respuesta al estrés depende de la variedad y especie. La determinación de proteína (gráfico 13) indica que existe un incremento de esta en todos los casos, pero para el 6% comienza a decaer, esto indica que a partir del día 11 comienza a perder agua. De igual manera en el parámetro de turbidez el 6% comienza la fase estacionaria, lo cual podría indicar el comienzo de la pérdida de agua. Por otro lado, la concentración de 3% muestra un crecimiento constante, por lo que se puede asumir que en esta concentración la homeostasis que buscan las células del explante puede mantenerse durante más tiempo que con 6%.

Para la variedad de Pinto Saltillo, el explante de raíz no presentó diferencias significativas en los parámetros de peso fresco, proteína y turbidez, pero sí en peso seco; este último puede deberse a las desviaciones estándar, ya que en la tabla 13 se muestra que la concentración de 3% es similar al control y al 6%, por lo que podemos asumir que las diferencias entre las 3 son muy sutiles; con lo que se confirma que esta variedad es resistente a la sequía. Por otro lado, tanto en el peso fresco como en el peso seco (gráficos 6 y 10) se muestra la misma tendencia, donde existe un periodo de adaptación y después incrementa el peso una vez que el explante se adapta al medio. En caso del control, el exceso de humedad, afecta la germinación. Esto es consistente con el tiempo de duplicación obtenido en la cinética de crecimiento, ya que este explante tarda más en adaptarse al medio y lograr la duplicación celular. En el caso del contenido de proteína, existe un incremento de proteína en esta fase de adaptación, por lo que al aumentar la concentración de PEG aumenta la concentración de proteína, al lograr adaptarse al medio, estas concentraciones decaen. En el caso de la turbidez, en este periodo de adaptación, para el control y el 3% incrementan los agregados celulares y posteriormente aumenta el número de células, pero en la concentración de 6% este

aumento no se presenta, ya que el potencial osmótico es muy alto y no logran formarse los agregados, es por esto que en el peso fresco y el peso seco la concentración de 6% es la que menor peso gana, ya que no logra adaptarse de igual manera que la del 3%. El hecho que con las determinaciones realizadas no se observe una diferencia significativa puede indicar que el mecanismo de respuesta es el ajuste osmótico, donde las células sintetiza cationes inorgánicos  $K^+$  y  $Cl^-$ , ácidos orgánicos, aminos, azúcares y aminoácidos para mantener su potencial alto, de esa manera asegura la entrada de agua al interior de las células ya que disminuye el potencial osmótico del exterior (Rosalban, *et al.*, 2014); por lo cual, las determinaciones utilizadas no son capaces de detectar este ajuste osmótico.

En el caso de la hoja, no se presentaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros. En los gráficos 7 y 11 se observa la misma tendencia, donde posterior a la fase de adaptabilidad, la concentración de 3% es la que muestra un mayor crecimiento en peso fresco y peso seco. Esto concuerda con lo obtenido en la cinética de crecimiento, ya que este explante es el que menor tiempo de duplicación tiene, debido a que en esta concentración no se tiene un exceso de humedad como en el control, por lo que se ve beneficiado el incremento de peso. También en el parámetro de turbidez la concentración de 3% muestra un mayor incremento de células. En el parámetro de proteína se observa que la fase adaptativa es menor que en el de la raíz, donde el 3% tiene el mayor incremento de proteína ya que se promueve la síntesis de proteínas para el crecimiento celular. Alemán, *et al.* 2010. reportan que, bajo estrés incrementa significativamente el contenido de prolina, así como Gonzales, *et al.* 2003 reporta, que existe un incremento en el metabolismo de ornitina y prolina al aumentar el estrés en plantas. Pese a que no se encontró diferencia significativa en la determinación de proteína, se observa un incremento en la producción de ésta. En la concentración del 6%, las células están en mayor estrés y se observa un incremento del contenido de proteína al final de la cinética, por lo que se puede asumir que el mecanismo de respuesta es similar al que se presenta durante la producción de prolina y/u ornitina cuando la planta está en estrés, aun cuando estadísticamente no hay diferencias significativas, se puede

pensar que esta respuesta tiene lugar por la tendencia que se presenta, posiblemente el tamaño de muestra no fue suficiente para observar esta diferencia.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Osorio 2019, ya que de igual manera se reportó que la variedad de Pinto Saltillo sometida a estrés osmótico (2%) tiene un mayor crecimiento. Por otro lado, se presentan varios ciclos celulares en dichos gráficos, esta diferencia puede radicar en la toma de muestra, ya que, en las células en suspensión al formarse agregados celulares, se puede correr el riesgo de no tomar una alícuota sin estos agregados si no se homogeniza de manera correcta antes de la toma de muestra. Además, factores como la edad del callo utilizado para la suspensión también pueden influir.

## **6.6 Regeneración**

Para realizar la regeneración de ambas especies se utilizó la ruta propuesta en la figura 7, la cual fue tomada del artículo publicado por Kwapata, *et al.*, 2009. En el cual reportan la regeneración de varias variedades de frijol. En la tabla 27 se muestra el avance de los brotes para cada variedad. Se puede observar que para ambas variedades se logró la regeneración obteniendo 2 plantas regeneradas para la variedad de Pinto Saltillo y una para la de Bayo Madero (figura 17).

Para ambas variedades los ejes embrionarios no mostraron ningún desarrollo, en cambio el cotiledón fue el explante que sirvió para el desarrollo de la regeneración de las plantas.

Para la variedad de Pinto Saltillo se observa que el medio C fue más favorable para la regeneración ya que, pese a que en ambos medios se obtuvo una planta, en este medio es donde se desarrollaron más brotes.

En el caso de Bayo Madero se observa que el medio B es más favorable, ya que fue en el único medio donde se dio el desarrollo de los brotes para obtener una planta regenerada.



**Figura 17. Plantas regeneradas de la variedad Pinto Saltillo donde A proviene del medio C y B del medio B.**

**Tabla 27. Número de explantes y plantas obtenidos a partir de la regeneración de embriones inmaduros.**

VARIEDAD	SEMILLAS	EXPLANTES		MEDIOS DE CULTIVO					NO. EXPLANTES CON CALLO	NO. EXPLANTES CON BROTES	NO. PLANTAS	
				24 HORAS	3 SEMANAS	4 SEMANAS	7 SEMANAS	5 SEMANAS				
PINTO	22			A								
		COTILEDÓN	41		B	D		E	6	2	1	
					C		D	E	9	17	1	
		EJE EMBRIONARIO	20		B	TODOS LOS EJES SE OXIDARON Y NO PROGRESARON						
					C							
BAYO	19	COTILEDÓN	36		B	D		E	7	26	1	
					C		D	E	3	0	0	
		EJE EMBRIONARIO	19		B	TODOS LOS EJES SE OXIDARON Y NO PROGRESARON						
	C											

Pese a que se utilizaron cotiledones para la regeneración, debido a que se utilizaron embriones inmaduros se caracterizó este proceso de regeneración como embriogénesis, donde su desarrollo se observa en la tabla 28.

Al desinfectar las vainas se asegura la asepsia al momento de remover los ejes embrionarios y separar los cotiledones (1). Posteriormente, al dejar en remojo con el medio A se busca la hinchazón de los embriones para facilitar su extracción. Después se probaron dos medios diferentes, el medio B y C, en el medio B es mayor la concentración de citocininas ya que tiene 2.5 mg de BA y menor de auxinas ya que tiene 0.1 mg de AIA, contrario el medio C que tiene menor cantidad de ambas al contener 0.05 mg de AIA y 1mg de TDZ (2).

Al pasar el tiempo determinado de cada medio, se transfirieron al medio D donde la cantidad de auxina y citocininas es la misma, con 1 mg de BA y 1mg de AIA, donde se buscó la proliferación de brotes adventicios (3). Por último, en el medio E se buscó el desarrollo de dichos brotes al utilizar solamente 0.1mg de AIA (4).

**Figura 18. Desarrollo del proceso de regeneración para *Phaseolus vulgaris* L.**



Pese a que se desarrollaron varios brotes para las dos variedades (Tabla 26) estos no lograron desarrollarse en plántulas completas, esto pudo deberse a que el medio E, que no tiene citocininas en su composición, causó que los brotes no lograran desarrollarse al momento de finalizar los experimentos; ya que al combinar una alta concentración de auxinas con un poco de citocininas se estimula la división celular, necesaria para el desarrollo de la plántula, sobre todo las plantas dicotiledóneas (George y Sherrington, 1984). Por otro lado, Trigiano y Gray, 2004. reportan que existen problemas para la proliferación de embriones y su maduración, porque es necesario el uso de una antiauxina, con la cual se reduce la proliferación, pero se

promueve la maduración de embriones, además que las citocininas promueven el desarrollo de brotes, altas concentraciones causan un mayor número de brotes, pero de tamaño pequeño y no logran desarrollarse.

Aunque se tenga registro de regeneración en *Phaseolus vulgaris* L., no se tiene para las variedades de Bayo Madero y Pinto Saltillo, esto debido al alta recalcitrancia del frijol. Otro problema reportado por Kwapata, *et al.* 2009., es la liberación de compuestos fenólicos, causando que la regeneración de brotes sea ineficiente, lo cual también pudo ser la causa de la poca maduración de los brotes obtenidos, ya que el tiempo en el medio E pudo ser excesivo para su desarrollo y la síntesis de estos compuestos pudo causar la inhibición de la formación de plántulas.

Por otro lado, Delgado *et al.*, 2005, reportan que, para las variedades de flor de julio marcela y flor de Mayo Anita la concentración óptima para lograr la regeneración es 5 ó 10 ml/l de BA sin importar la concentración de adenina, y Gatica, *et al.*, 2010, reportan 5 mg de BA y 20 o 40 de Sulfato de Adenina. Pese a estos reportes de regeneración utilizando BA, desde el apartado de Germinación observamos que el BA no tiene un efecto sobre la variedad de Pinto Saltillo, ya que el medio B, es donde menos brotes desarrolló esta variedad, además que la planta regenerada (figura 14) fue menos prolifera que la que proviene del medio C, esto puede deberse a que Pinto Saltillo es una variedad mejorada y el BA no surte efecto sobre ella.

Ya que cada variedad requiere concentraciones y combinaciones de auxinas y citocininas diferentes, el protocolo empleado es una buena aproximación para establecer un sistema más eficiente para la regeneración de Bayo Madero y Pinto Saltillo, ya que si se modifica el medio E para permitir la maduración de los brotes y se prueban diferentes tiempos para los medios se podrían regenerar un mayor número de plantas a partir de embriones inmaduros.

## **VII. CONCLUSIONES**

- El porcentaje de germinación bajo condiciones de hidroponía fue mayor en las dos variedades Bayo Madero y Pinto Saltillo en comparación con otro tipo de sustrato compuesto por tierra, agrolita 3:1, sin embargo, bajo la condición

de hidroponia Pinto Saltillo tuvo un mayor porcentaje de germinación que Bayo Madero.

- En condiciones *in vitro* y en presencia de BA a una concentración de  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  la variedad Bayo Madero presentó mayor porcentaje de germinación que Pinto Saltillo.
- Los cultivos de callos de Bayo madero demostraron mayor proliferación en que los de Pinto saltillo, ya que la cinética de crecimiento mostró que la etapa logarítmica se mantiene más tiempo en Bayo Madero que Pinto Saltillo.
- En cuanto los parámetros calculados, el callo proveniente del explante de raíz tiene un tiempo de duplicación mayor debido a que su tiempo de adaptación al medio es mayor, por otro lado, el de hoja tiene un mayor índice de crecimiento debido a que el callo se hidrata más. En cuanto a las variedades, Pinto Saltillo tiene un callo menos hidratado, para el explante de hoja el tiempo de duplicación menor respecto al de raíz, ya que este explante requiere un mayor tiempo de adaptación a medios donde el agua este más biodisponible.
- La metodología empleada para la determinación del contenido de proteína para Bayo Madero y Pinto Saltillo no permitió determinar las diferencias en el crecimiento de las células en suspensión crecidas en tres concentraciones de PEG 8000.
- El explante de raíz de la variedad de Bayo Madero disminuye su crecimiento en medios con PEG 8000 en concentraciones de 3% y 6% debido a que el explante no logra adaptarse al estrés hídrico y la variedad es susceptible al estrés hídrico.
- Los cultivos del explante de hoja de la variedad de Bayo Madero aumenta su crecimiento en medios con PEG 8000 en concentraciones de 3% y 6% debido a que se puede suponer que la respuesta adaptativa del explante es la expansión celular para llegar a la homeostasis.
- Los cultivos de los explantes de hoja y raíz de la variedad de Pinto Saltillo no se ven afectados significativamente en medios con PEG 8000 en

concentraciones de 3% y 6% debido a que Pinto Saltillo es resistente a sequías, donde el mecanismo de adaptabilidad puede ser el ajuste osmótico y/o la producción de prolina.

- Se probaron dos explantes, ejes embrionarios y cotiledones, siendo los cotiledones los que dieron una respuesta morfogenética, por lo cual se demostró los ejes por sí solos no son un buen explante para la regeneración de estas dos variedades de frijol.
- Con la ruta propuesta para la regeneración, Bayo Madero se benefició con la ruta utilizando el medio B, debido a que tiene una concentración de BA de  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  y Pinto Saltillo, al no mostrar efecto bajo a la exposición de BA, se benefició con el medio C, que tiene una concentración 0.05 mg de AIA y 1mg de TDZ.
- El medio E no fue efectivo para la maduración de los brotes obtenidos, debido a que no cuenta con citocininas en su composición.

#### **VIII. PERSPECTIVAS**

- A partir del establecimiento de cultivos de células en suspensión con PEG 8000, se identificarán las proteínas que participan en la adaptabilidad de Pinto Saltillo para su aislamiento.
- Se buscará la transformación de Bayo Madero con la inserción de las proteínas aisladas de Pinto Saltillo.
- Se volverá a probar la ruta de regeneración propuesta, variando los tiempos para encontrar las condiciones adecuadas para cada variedad.
- Se probarán diferentes medios substituyendo el medio E para lograr el desarrollo de los brotes en menor tiempo para la regeneración de plántulas completas.

## IX. ANEXOS

**Tabla 29. Medio de cultivo conocido como MS (Murashige & Skoog, 1962)**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
<b>COMPUESTOS INORGÁNICOS</b>				
<b>Macronutrientes</b>				
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	101.108	1900	18.791
Nitrato de Amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	1650	20.614
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147.02	440	2.993
	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	128.99	385.93	2.993
	CaCl <sub>2</sub>	110.99	332.08	2.993
Sulfato de Magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246.498	370	1.501
Fosfato de Potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	154.086	192.48	1.249
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	170	1.249
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174.2	217.6	1.249
<b>Micronutrientes</b>				
Sulfato de Manganeso	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	223.0618	22.3	0.099
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169.01	16.7	0.099
Sulfato de Zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287.54	8.6	0.0299
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.86	6.2	0.1002
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.99x10 <sup>-3</sup>
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249.68	0.025	0.1 μM
Molibdato de Sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	241.95	0.25	1.03 μM
Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	237.93	0.025	0.105 μM
Sulfato Ferroso	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278.028	27.8	0.1
Na <sub>2</sub> EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub>	336.2	33.28	0.099
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	372.3	37.3	0.099

<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS</b>				
<b>AMINOÁCIDOS</b>				
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.07	2	0.0266
<b>VITAMINAS</b>				
Myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S.HCl	337.3	0.1	2.964x10 <sup>-4</sup>
Ácido Nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	123.1	0.5	4.062x10 <sup>-3</sup>
Piridoxina-HCl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	205.6	0.5	2.432x10 <sup>-3</sup>

**Tabla 30. Soluciones concentradas (100x) del medio conocido como MS (Murashigue & Skoog 1962)**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	500 mL (g)	250 mL (g)	100 mL (g)	50 mL (g)
<b>Solución I: NITRATOS</b>						
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	190	95	47.5	19	9.5
Nitrato de Amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165	82.5	41.25	16.5	8.25
<b>Solución II: SULFATOS</b>						
Sulfato de Magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	37	18.5	9.25	3.7	1.85
Sulfato de Manganeso	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2.23	1.115	0.5575	0.223	0.1115
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.69	0.845	0.4225	0.169	0.0845
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.86	0.43	0.215	0.086	0.043
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0025	0.00125	0.000625	0.00025	0.000125
<b>Solución III: HALÓGENOS</b>						
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	44	22	11	4.4	2.2
	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	38.5	19.25	9.625	3.85	1.925
	CaCl <sub>2</sub>	33.2	16.6	8.3	3.32	1.66
Yoduro de Potasio	KI	0.083	0.0415	0.02075	0.0083	0.00415
Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0025	0.00125	0.000625	0.00025	0.000125

<b>Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO</b>						
Fosfato de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	19.248	9.624	4.812	1.9248	0.9624
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17	8.5	4.25	1.7	0.85
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	21.76	10.88	5.44	2.176	1.088
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.62	0.31	0.155	0.062	0.031
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0125	0.00625	0.0025	0.00125
<b>Solución V: QUELANTES</b>						
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784	1.392	0.696	0.2784	0.1392
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$	3.36	1.68	0.84	0.336	0.168
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.724	1.862	0.931	0.3724	0.1862

**Tabla 31. Soluciones concentradas (100x) del coctel de vitaminas conocido como R2.**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	PM (g)	Concentración (mg) para preparar 1l
<b>Vitamina R2 (MS modificado)</b>			
Myoinositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180.2	100
Ácido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	123.1	1
Piridoxina hidrocloide	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	205.6	1
Tiamina hidrocloide	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OSCl} \cdot \text{HCl}$	337.3	2

## X. BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta-Díaz, Efraín, Trejo-López, Carlos, Ruiz-Posadas, Lucero del Mar, Padilla-Ramírez, J. Saúl, Acosta-Gallegos, Jorge A., *Adaptación del frijol a sequía en la etapa reproductiva*. Terra Latinoamericana [en línea] 2004, 22 (Enero-Marzo): [Fecha de consulta: 4 de agosto de 2019] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57311208006>> ISSN.
- Acosta-Gallegos, J. A. 1982. Bayo Madero y Bayo Los Llanos, nuevas variedades de frijol para el norte centro de México. INIA, Durango. 090. 8 p. (Folleto Técnico Núm. 1).
- Alemán, Silvia; Domínguez, Amalia; Domínguez, Diamarys; Fuentes, Leticia; Miranda, Kelhy; Pérez, Yunel; Pernía, Beatriz; Sosa, Daynet; Sosa, Maryla; Infante, Diógenes Estudio anatómico y bioquímico en materiales cubanos y venezolanos de *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de estrés hídrico RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios, vol. 2, núm. 1, enero-junio, 2010, pp. 89-99 Fundación Instituto de Estudios Avanzados Caracas, Venezuela.
- Amooaghaie R. (2011). The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under salt stress. African Journal of Biotechnology 10, 6269-6275.
- Bevan, M. y Northecote, D.H. (1981) Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of *Salpigrossis sinuata* L. Z. Pflanzenphysiik. 99: 471-474.
- Blaha G., Stelzl U., Spahn C.M.T., Agrawal R.K., Frank J., Nierhaus K.H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. Methods in Enzymology 317, 292-309.
- Bojórquez-Quintal J.E., Echevarría-Machado I., Medina-Lara F., Martínez-Estévez, M.(2012). Plants challenges in a salinized world: The case of *Capsicum* African Journal of Biotechnology 11, 13614-13626

- Bojórquez J. 2015. Mecanismos de Tolerancia a salinidad en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinese* Jacq.) Tesis de doctorado. Centro de investigación Científica de Yucatán.
- Calva, G. y Pérez, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, 6(11), 1-16.
- Campos A., J. 1987. Enfermedades del frijol. Trillas. México. 132 p.
- Chieng Linna M.N., T.Y. Chen, S.L. Sim y Doreen K.S. Goh. Induction of organogenesis and somatic embryogenesis of *Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz (Ramin) in Sarawak. 2014, SARAWAK FORESTRY, Malaysia.
- CIAT (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. van Schoonhoven, A.; Pastor-Corrales, M.A. (Comps.). Cali, Colombia. 56p.
- Contreras F. 2016. Desarrollo de métodos de propagación in vitro del alcaparro (*Capparis spp.*) (tesis de maestría) Universidad Autónoma de Aguascalientes
- Debouck D, R Hidalgo, 1985. Morfología de la planta de frijol común. In: Frijol: Investigación y Producción. M López, F Fernández, A van Schoonhoven (eds). CIAT, Cali, Colombia. pp:7–47.
- Delgado P., Saucedo M., Guzmán S., Villordo E., Gonzales M., Fraire S., Acosta J., y Mora A., (2005) An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Sciense direct.
- FAOSTAT, 2017. Base de datos: Frijol, [Fecha de consulta: 22 de octubre de 2019]
- Flowers T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. Journal Experimental Botany 55, 1-13.
- Freire M. (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Universidad Central Biotecnología vegetal Vol. 3 Cuba.
- Fowler, M. W. (1971). Studies on the growth in culture of plant cells: XIV. Carbohydrate oxidation during the growth of *Acer pseudoplatanus* L. Cells in suspension culture. J.Exp.Bol. 22: 715-724.

- Gatica A., Muños J., Ramírez., Valdez M. (2009), In vitro plant regeneration system for common bean *Phaseolus vulgaris*: effect of N<sup>6</sup>-benzylaminopurine and adeninde sulphate. Pontifica Universidad Católica, Chile
- Gaucín, S. y Torres, E. *Panorama Agroalimentario*. Dirección de Investigación Económica y Sectorial (DIES), (2012).
- George, E., Hall, M., Klerk, G., (2008) Plant propagation by tissue culture. Países bajos, Springer, Tercera edición. Pp: 2, 136-137.
- George E. y Sherrington P. (1984) Plant propagation by tissue culture, Exegetics Ltd. pp: 126, 140, 159, 166, 225-226, 307-308.
- INAFAP, 2006. Pinto saltillo, Nueva variedad de frijol para el altiplano de México. pp: 5-6.
- Kwapata, K, Sabzikar R., Sticklen M. y Kelly J. (2009) In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell Tiss Organ Cult*.
- Mohamed F. Mohamed & Azza A. Tawfik (2008) Breeding for Drought Resistance in Common Bean: InVitro Assay for Root Osmotic Potential, *Journal of Crop Improvement*, 22:2, 209-224.
- Moreno L. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. 2009 *Agronomía Colombiana*, pp: 179-191 Colombia.
- Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of PlantBiology* 59, 651-681
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Nilsen, E.T. y D.M. Orcutt. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley and Sons, New York, NY
- Rosales S., R.; J. A. Acosta G.; J. S. Muruaga M.; J. M. Hernández C.; G. Esquivel E. y P. Pérez H. 2004. Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Núm. 6. Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Chapingo, Edo. de México. 148 p

- Roy S.J., Negrão, S., Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26, 115-124
- SAGARPA, 2016. Panorama agroalimentario, 2-12.
- SAGARPA, 2017. Planeación agrícola nacional 2017-2030, 1-4.
- Sánchez I. 2006, Pinto Saltillo, Nueva variedad de frijol para el altiplano de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental Saltillo, México.
- Saran S. y Kumar P, 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, Springer, India. Pags: 27-34
- Shabala S., Cuin, T.A. (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133, 651-669.
- Smith, R. 2013. *Plant Tissue Culture: Techniques and experiments*, 3rd ed. USA: Elsevier, Cap. 3, 6 & 7. Págs. 39, 40, 63.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Trigiano R. y Gray D., 2004. *Plant Development and Biotechnology* CRC Press, USA, pp: 163
- Universidad Nacional de San Luis (UNSL), biblioteca digital, 2010. Crecimiento y cultivo vegetal. [En línea]. Disponible en: [bd.unsl.edu.ar/download.php?id=1952](http://bd.unsl.edu.ar/download.php?id=1952) [Último acceso el 26 de noviembre de 2018].
- Ulloa J. et. al, 2011, El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos, *Revista Fuente* Año 3.
- Van Schoonhoven, A. y O. Voyset. 1989. Common bean in Latin America and their constraints. pp. 33-57. In: Schwartz, H.F. y M.A. Pastor-Corrales (eds.). *Bean production problems in tropics*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Calí, Colombia.
- Verma, D.P.S y A. Marcus (1974). Activation of protein synthesis up on dilution of *Aractus* cell culture from stationary pase. *Plant physiol* 53: 83-84.

- Villavicencio L.G. 2002. Optimización y caracterización fisiológica y bioquímica de cultivos en suspensión de células de maíz (*Zea mays*, L. raza chalqueño). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zárate M.A. 2014. Manual de hidroponía. Instituto de biología. México.