

03072

4
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
Colegio de Ciencias y Humanidades**

Instituto de Biotecnología

**Regeneración de Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa a
partir de diversos explantes**

**Tesis para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología
que presenta
Fernando Flores Díaz**

Cuernavaca, Morelos.

1993.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

I.	INTRODUCCION.-----	1
II.	RESUMEN. -----	2
III.	ANTECEDENTES.	
III.1.1.	El cultivo del frijol y sus problemas en América Latina. -----	3
III.1.2.	Los patógenos portados por la semilla de frijol.	
III.1.2.1.	Hongos. -----	4
III.1.1.2.	Bacterias. -----	4
III.1.1.3.	Virus. -----	6
III.2.	El cultivo del frijol y sus problemas en México.	6
III.2.1.	Las enfermedades del frijol más comunes en México.	8
III.2.2.	Producción y certificación de semillas en México.	8
III.3.	Limpieza del material propagativo.-----	9
III.3.1.	Selección de fuentes de material propagativo.---	11
III.3.2.	Manejo de material propagativo.-----	11
III.4.	Pureza genética, producción y certificación de semillas. -----	12
III.4.1.	Calidad de la semilla.-----	13
III.4.2.	Producción de semilla de frijol libre de patógenos por la técnica tradicional.-----	13
III.4.3.	Multiplicación de la semilla de frijol libre de patógenos en el campo.-----	14
III.5.	Generalidades de la técnica de Cultivo de tejidos vegetales.-----	17
III.5.1.	Las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal-----	20
III.5.2.	Erradicación de virus y patógenos por medio del cultivo "in vitro" de meristemos.-----	23
III.5.3.	Propagación clonal en <u>Phaseolus vulgaris</u> .-----	25
III.5.4.	Embriogénesis somática y morfogénesis.-----	26
III.5.5.	Embriogénesis en <u>Phaseolus vulgaris</u> .-----	28
III.5.6.	Cultivo de células en suspensión.-----	29
IV.	JUSTIFICACION.-----	32
V.	OBJETIVOS.	
V.1.	Objetivo general.-----	33
V.2.	Objetivos particulares.-----	33
VI.	MATERIALES Y METODOS.	
VI.1.	Medios de cultivo.-----	34
VI.2.	Métodos de esterilización de semillas.-----	34
VI.3.	Condiciones de germinación "in vitro".-----	36
VI.4.	Diseción de los explantes.-----	36
VI.5.	Condiciones de desarrollo de los explantes "in	

	vitro".-----	40
VI.6.	Condiciones de desarrollo de las plántulas en suelo.-----	40
VII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	
VII.1.	Homogenización del material propagativo.-----	40
VII.2.	Cuadro de pruebas realizadas "in vitro".-----	45
VIII.	RESULTADOS	
VIII.1.	Resultados en la fase de cultivo "in vitro".----	47
VIII.2.	Resultados en campo.-----	50
IX.	DISCUSION.-----	62
X.	CONCLUSION.-----	64
XI.	FIGURAS. -----	68
XII.	BIBLIOGRAFIA.-----	91

LISTA DE TABLAS.

TABLA N°	página.
1. Hongos que atacan al frijol en América Latina.-----	5
2. Bacterias y virus que atacan al frijol en América Latina.-----	7
3. Técnica empleada por el CIAT para producir de 10 a 100 g de semilla libre de patógenos.-----	15
4. Componentes del medio de Murashigue y Skoog y las vitaminas B5.-----	35

LISTA DE ESQUEMAS.

ESQUEMA N°	página.
1. Esquema de pruebas realizadas "in vitro". Variaciones en los medios de cultivo.-----	37
2. Esquema de condiciones de germinación "in vitro".-----	38
3. Esquemas de explantes cultivados "in vitro".-----	39
4. Esquema general de trabajo. Ruta de organogénesis.-----	43
5. Esquema general de trabajo. Ruta de embriogénesis somática.-----	44
6. Esquema de producción de semilla libre de patógenos.---	66
7. Esquema de producción de semilla de frijol libre de patógenos.-----	67

LISTA DE CUADROS.

CUADRO N°	
I. Abreviaturas.	IV
1. Cuadro de pruebas realizadas con diversos explantes de <u>Phaseolus vulgaris</u> variedad Negro Jamapa.-----	45
2. Cuadro general de resultados.-----	52
3. Resumen de resultados relevantes.-----	61

Figura N°	Lista de Figuras.	página
1.	Desarrollo del brote apical en medios complementados con extracto de semilla.-----	68
2.	Desarrollo del brote apical en medios complementados con extracto de semilla.-----	69
3.	Desarrollo del brote apical en el medio MS/B5.-----	70
4.	Desarrollo del brote apical a los 23 días de cultivo "in vitro"-----	71
5.	Desarrollo de los meristemos bajo diversos tratamientos.-----	72
6.	Desarrollo de los meristemos bajo diversos tratamientos.-----	73
7.	Desarrollo de los meristemos bajo diversos tratamientos.-----	74
8.	Inicio de la fase de adaptación a suelo de las plantas regeneradas a partir de brotes apicales.-----	75
9.	Desarrollo de las plantas regeneradas a partir de brotes apicales. Fase de cultivo en suelo-invernadero.	76
10.	Desarrollo de las plantas regeneradas a partir de brotes apicales. Fase de cultivo en suelo-invernadero.	77
11.	Desarrollo de las plantas regeneradas a partir de brotes apicales. Fase de cultivo en suelo-invernadero.	78
12.	Aspecto del ejote y las semillas de plantas regeneradas a partir de brotes apicales.-----	79
13.	Pruebas en invernadero de las semillas R0 y producción de semilla R1.-----	80
14.	Pruebas de la semilla R1.-----	81
15.	Pruebas de la semilla R1. (Localidad de Roque, Gto.).	82
16.	Pruebas de la semilla R1. (Localidad de Mazatepec, Mor)	83
17.	Floración y fructificación de las plantas regeneradas a partir de meristemos.-----	84
18.	Floración y fructificación de las plantas regeneradas a partir de meristemos.-----	85
19.	Semillas y vainas de las plantas regeneradas a partir de brotes apicales.-----	86
20.	Problemas fitosanitarios en las plantas R1 cultivadas en regiones temporaleras. (Localidad de Cortazar, Gto.).	87
22.	Pruebas de campo con semilla R1. (Localidad de Miacatlán, Mor.)-----	88
23.	Callogénesis.-----	89
24.	Brotación múltiple "in situ".-----	90

CUADRO DE ABREVIATURAS.

MS	Murashigue y Skoog
B5	Gamborg
AlA	Acido Indol-3-acético.
ANA	Acido Naftalen acético.
2,4- D	Acido 2,4-dicloro fenoxiacético.
AG	Acido Giberélico.
Kin	Cinetina.
BA	Bencil Adenina
S. Aden.	Sulfato de Adenina.
Sac.	Sacarosa.
Mal.	Maltosa.
Glu.	Glucosa.
Ext. Cru.	Extracto Crudo.
Ext. Coc.	Extracto Cocido.
Mer.	Meristemo.
B. Apl.	Brote Apical.
Hj.	Hoja.
Cot.	Cotiledón.
I. Cot.	Internodo cotiledonario.
Emb. Inmad	Embrión Inmaduro.
Hip.	Hipocotilo.

I. INTRODUCCION.

En varios países de América Latina incluido México, el frijol es un cultivo muy importante ya que se destina a la alimentación humana. Sin embargo en la actualidad el cultivo y consumo de este grano básico ha disminuido debido al desplazamiento de las áreas de producción de esta planta a zonas marginales lo cual es generado por su baja rentabilidad y a los problemas inherentes de este cultivo. Esto ocasiona que la siembra de frijol se realice en pequeñas fincas, lo cual limita la inversión en insumos y tecnología aplicada en su producción.

El frijol es atacado por una serie de enfermedades virósas, bacterianas y fungosas que en algunos casos llegan a diezmar completamente su productividad. Un alto porcentaje de estas enfermedades son transmitidas por semilla y este problema se ve agravado debido a que los agricultores apartan de la cosecha la semilla que será empleada en el ciclo agrícola siguiente; práctica que se realiza sin control de calidad alguno y en la mayoría de los casos sin las tecnologías adecuadas para este proceso.

Hoy en día se emplean diversas técnicas para producir semilla libre de patógenos y enfermedades pero la naturaleza de estas técnicas no permite producir grandes cantidades de materiales propagativos certificados y tampoco permiten obtener el 100% de certeza de la calidad fitosanitaria del material.

La técnica de propagación clonal "in vitro" a partir de meristemas ha sido utilizada con éxito en la erradicación de patógenos portados por los materiales propagativos de diversas especies. Existen algunos trabajos de regeneración de plantas de Phaseolus vulgaris de diversas variedades por medio de esta técnica en los que se han obtenido plantas capaces de florecer y fructificar; sin embargo, en ninguno de estos casos se ha enmarcado a la micropropagación de frijol en programas de certificación de semillas.

En la actualidad el método más eficiente para erradicar un patógeno es por medio de la producción de variedades resistentes al patógeno, pero el tiempo requerido para producir una nueva variedad por medio de las técnicas tradicionales y liberarla al mercado puede llevarse hasta 15 años.

Es un hecho que a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales e ingeniería genética es factible lograr un alto grado de mutantes con características deseables en periodos de tiempo relativamente cortos, lo cual se vislumbra como una alternativa muy prometedora para producir variedades resistentes. Sin embargo la aplicación de estas técnicas en frijol se ve limitada debido a la carencia de protocolos de regeneración.

II. RESUMEN:

En el medio de Murashigue y Skoog complementado con las vitaminas de Gamborg, 1.0 mg/l de ácido naftalenacético y 2.2 mg/l de ácido indol-3-acético, se generó un enraizamiento abundante y acelerado del brote apical y las yemas axilares en un periodo de 21 días, al ser cultivadas "in vitro". Las plantas regeneradas en este medio fueron transferidas a suelo, lográndose una adaptación del 100% en el invernadero. Estas plantas se desarrollaron vigorosas y con aspecto normal produciendo semilla de tamaño y vigor superior al promedio. Esta semilla al ser cultivada bajo cielo abierto tuvo una germinación vigorosa y del 100%. La floración de estas plantas fué precoz en 15 días con respecto al lote de semilla comercial y el llenado de las vainas a los 90 días fué completo, mientras que su contraparte comercial tardó aún 24 días más para completar el ciclo.

Los meristemos se cultivaron asepticamente en el mismo medio base, pero cuando se añadió 0.1 mg/l de ácido naftalen acético y 0.1 mg de 6-bencil adenina se generó un brote que fué transferido al medio empleado para enraizar los brotes apicales, obteniéndose plantas que no presentaron ni tamaño ni apariencia normal; pero que florecieron y produjeron semillas de manera precoz y por un periodo de tiempo prolongado. Esta semilla al ser sembrada en invernadero produjo una progenie que se desarrolló vigorosamente, floreciendo y fructificando de manera normal. Esta nueva generación de semillas se sembró en campo, obteniéndose una germinación uniforme, un desarrollo vigoroso de las plantas y una producción superior al promedio nacional de producción.

El establecimiento de cultivos celulares en suspensión fué alcanzado al germinar semillas de frijol en el medio de Murashigue y Skoog adicionado con 5 mg/l de 6-bencil adenina y en condiciones de iluminación. De las plántulas fueron tomados meristemos apicales y fragmentos de hojas, ambos explantes fueron subcultivados en el mismo medio base al cual le fueron agregados 3.0 mg/l de ácido 2,4-dicloro fenoxi acético y 1.0 mg/l de 6-bencil adenina. En este medio tanto los meristemos como los fragmentos de hoja produjeron un abundante callo de color blanco, el cual al ser transferido a medio líquido en agitación se disgregó con facilidad y produjo abundancia de células en suspensión.

III. ANTECEDENTES.

III.1. EL CULTIVO DEL FRIJOL Y SUS PLAGAS EN AMERICA LATINA.

Más de un tercio de la producción mundial de frijol proviene de América Latina. El rendimiento aproximado en esta región es de 600 kg/ha. Los Estados Unidos de Norteamérica tiene un rendimiento de 1400 kg/ha en este cultivo. En condiciones experimentales América Latina produce de 3000 a 5000 kg/ha.

En la década de los 70 y principio de los 80 la tasa de crecimiento de la producción de frijol en América Latina fué de 0.27% mientras que la tasa de crecimiento de la población en ésta región fué del 2.80%, lo cual generó una disminución en el consumo per capita de éste básico y un aumento en la importación, lo que aunado al aumento del precio de las leguminosas ha generado un endeudamiento mayor de los países latinoamericanos.

En América Latina el cultivo de frijol ha mostrado una disminución en la productividad la cual es debida a las condiciones cambiantes del clima, la pobre fertilidad de los suelos destinados a éste cultivo y a las enfermedades y plagas que lo azotan.

Brasil produce el 54% del frijol latinoamericano y México el 23%; siendo primer y segundo lugar respectivamente en la producción de este grano. En ambos países el rendimiento del frijol ha disminuido también debido al desplazamiento de éste hacia áreas marginales de producción, lo cual ha sido ocasionado por el auge de cultivos más rentables como la soya, los cultivos ornamentales o los cultivos destinados a la exportación. Este desplazamiento se debe al riesgo inherente a la producción del frijol, los bajos rendimientos y rentabilidad, a la inestabilidad de los precios y a la dificultad de mecanizar la cosecha. Todo esto ha generado que la producción de frijol en América Latina se lleve a cabo en fincas pequeñas, lo cual implica una capacidad de inversión en insumos baja, el empleo de cultivos asociados y el cambio de áreas de producción a medida que la fertilidad del suelo disminuye o éste se erosiona (Sanders y Schwartz 1979).

Dentro de los riesgos inherentes al cultivo del frijol están el ataque de plagas y enfermedades. Entre los patógenos causales de enfermedades en el frijol común están el virus del mosaico común, el añublo bacteriano y la antracnosis, los cuales son capaces de infectar la semilla y por lo tanto de ser transmitidos por medio de ésta.

La semilla que utilizan los agricultores latinoamericanos por lo regular es de mala calidad, principalmente entre los propietarios de parcelas pequeñas. En América Latina solo el 3% de la semilla de frijol empleada para cultivo es certificada (Wetzel et al. 1972). El 54% de las enfermedades de frijol son transmitidas por semilla (Ellis et al. 1974). EL efecto de los patógenos portados en la semilla de frijol no está bien estudiado pero se les asocia con la disminución en los porcentajes de germinación y emergencia de la

plántula (Ellis et al. 1976).

Para contrarestar el efecto nocivo de los patógenos portados por la semilla de frijol, en América Latina se emplean varios sistemas de control de enfermedades de éste cultivo tales como prácticas culturales adecuadas, rotación de cultivos, medidas sanitarias de enfermedades, producción de semilla limpia o libre de patógenos, control químico y mejoramiento por resistencia.

III.2. LOS PATOGENOS PORTADOS POR LA SEMILLA DE FRIJOL.

III.2.1. Hongos.

El frijol es portador de un gran número de hongos en la semilla entre los que destacan los enlistados en la tabla N°1. Muchos de estos hongos también son portados por otros miembros de la familia de las leguminosas (Ellis et al. 1976). Un gran número de los hongos portados por la semilla infectan a los cotiledones y al embrión debido a que se encuentran entre la testa y el cotiledón (Bolkan et al. 1976; Ellis et al. 1976).

Los fungicidas de contacto como el Captán, el Ceresán y el Arasán o Tiram pueden penetrar la testa del frijol pero no pueden penetrar dentro de los cotiledones (Ellis et al. 1976). Los fungicidas sistémicos como el benomil pueden penetrar la testa y el cotiledón de frijol y brindar cierto grado de control (Bolkan et al. 1976; Ellis et al. 1976). Los fungicidas pueden ser útiles en la producción de semilla limpia en América Latina pero no pueden garantizar una limpieza total de la semilla.

III.2.2. Bacterias.

Dentro de las especies de bacterias más comunes portados por la semilla de frijol común están las enlistadas en la tabla N°2. Hasta la fecha se conocen al menos 95 especies y variedades de estos microorganismos que pueden ser portados por la semilla de numerosos cultivos (Schuster y Coyne 1974).

La semilla de frijol puede portar internamente varias especies de bacterias patógenas como por ejemplo Xanthomonas phaseoli, Corynebacterium flaccumfaciens, las cuales pueden permanecer viables en la semilla de dos a diez años en el primer caso y de cinco a veinticuatro años en el segundo (Schuster y Coyne 1974).

Uno de los métodos más efectivos para obtener semilla libre de patógenos consiste en emplear variedades que sean resistentes o inmunes a dicho patógeno (York et al. 1977); sin embargo ningún tratamiento controla totalmente a las bacterias portadas internamente por el frijol común (Taylor y Dudley 1977).

El método más satisfactorio para controlar a las bacterias es seleccionar áreas donde las condiciones ambientales y las prácticas culturales sean adversas para el crecimiento y

TABLA N°1
HONGOS QUE ATACAN AL FRIJOL EN AMERICA LATINA (Ellis y Gálvez
1979).

O R G A N I S M O

N O M B R E C O M U N .

<u>Acrostalagmus spp.</u>	-----
<u>Alternaria spp.</u>	Mancha de hojas y vainas.
<u>Ascochyta spp.</u>	Mancha de hojas y vainas.
<u>Aspergillus candidus.</u>	Pudrición en almacenamiento.
<u>Aspergillus glaucus.</u>	Pudrición en almacenamiento.
<u>Aspergillus niger.</u>	Pudrición en almacenamiento.
<u>Aspergillus repens.</u>	Pudrición en almacenamiento.
<u>Aspergillus restrictus.</u>	Pudrición en almacenamiento.
<u>Botrydiploidia theobromae.</u>	Deterioro de la semilla.
<u>Botrytis cinerea.</u>	Moho gris.
<u>Cercospora cruenta.</u>	Mancha foliar.
<u>Chaetoseptoria wellmanii.</u>	Mancha foliar.
<u>Cladosporium herbarum.</u>	Mancha por Cladosporium.
<u>Colletotrichum dematium.</u>	-----
<u>Colletotrichum lindemuthianum.</u>	Antracnosis
<u>Colletotrichum truncatum.</u>	Antracnosis del tallo.
<u>Curvularia spp.</u>	Mancha foliar.
<u>Dendrophoma spp.</u>	-----
<u>Diaporthe phaseolorum.</u>	Añublo del tallo y la vaina.
<u>Diplodia natalensis.</u>	Contaminante de la semilla.
<u>Erysiphe polygoni.</u>	Mildeo polvoso.
<u>Fusarium equiseti.</u>	Damping Off.
<u>Fusarium moniliforme.</u>	-----
<u>Fusarium oxysporum</u> f. sp. phaseoli.	Amarillamiento por Fusarium.
<u>Fusarium roseum.</u>	-----
<u>Fusarium semitectum.</u>	Deterioro de la vaina.
<u>Fusarium solani.</u>	Pudrición de la raíz.
<u>Fusarium sulphureum.</u>	-----
<u>Isariopsis griseola.</u>	Mancha foliar angular.
<u>Macrophomina phaseolina.</u>	Pudrición gris de la raíz.
<u>Monilia spp.</u>	-----
<u>Mucor spp.</u>	-----
<u>Nematospora coryli.</u>	Mancha de levadura.
<u>Nigrospora spp.</u>	-----
<u>Penicillium spp.</u>	Pudrición en almacenamiento.
<u>Pestalotiopsis spp.</u>	-----
<u>Peyronellea spp.</u>	-----
<u>Phomopsis phaseolina.</u>	Mancha de hojas y vainas.
<u>Rhizoctonia solani.</u>	Pudrición de la raíz.
<u>Rhizopus spp.</u>	Pudrición suave.
<u>Sclerotinia sclerotiorum.</u>	Moho blanco.
<u>Sclerotium rolfsii.</u>	Añublo sureño.
<u>Sporotrichum spp.</u>	-----
<u>Stemphylium spp.</u>	Mancha foliar.
<u>Thanatephorus cucumeris.</u>	Mustia hilachosa.

desarrollo de éstas (Guthrie 1975). Copeland et al. (1975) recomiendan la rotación prolongada de cultivos, alternar las variedades en cada ciclo de cultivo y sembrar en secuencia los terrenos adyacentes con el propósito de reducir las grandes extensiones con plantas susceptibles que pudieran cultivarse simultáneamente con el frijol.

En la actualidad no existe ninguna variedad inmune a la infección causada por el añublo común.

III.2.3. Virus.

Entre los virus más comunes transmitidos por la semilla del frijol están el virus del mosaico común del frijol, el virus del mosaico occidental del frijol, el virus del mosaico sureño del frijol, el virus rayado del tabaco, el virus del mosaico del pepino y el enrollamiento de las hojas de cerezo (Ellis y Gálvez 1979). En la tabla N°2 se enlistan los virus que atacan al frijol en América Latina.

El virus del mosaico común del frijol es transmitido dentro de los cotiledones y el embrión pero no por la testa (Ekpo y Saettler 1974).

Una vez que la semilla ha sido infectada por virus ningún tratamiento tradicional podrá ser aplicado para erradicar al patógeno.

El procedimiento tradicional más efectivo para producir semilla limpia es hacerlo en áreas donde se puedan eliminar las plantas infectadas por el virus y donde los vectores puedan ser controlados o no existan.

III.3. EL CULTIVO DEL FRIJOL Y SUS PROBLEMAS EN MEXICO.

El cultivo de frijol en México no queda exento de la problemática presentada en América Latina y se pueden mencionar dentro de los aspectos que inciden negativamente en el rendimiento del frijol en nuestro país los siguientes:

- a). Se cultiva en condiciones de temporal.
- b). Se cultiva de manera asociada, lo cual genera un descuido sobre este cultivo.
- c). No se emplean variedades mejoradas.
- d). La semilla empleada es producida por el agricultor y por lo general procede de la misma parcela de producción, razón por la cual no existe un control sanitario sobre el material propagativo.

TABLA N°2
BACTERIAS QUE ATACAN AL FRIJOL EN AMERICA LATINA (Ellis y Gálvez 1979).

ORGANISMO	NOMBRE COMUN
<u>Achromobacter spp.</u>	
<u>Aerobacter aerogenes.</u>	
<u>Agrobacterium radiobacter.</u>	
<u>Alcaligenes viscosus.</u>	
<u>Bacillus cereus.</u>	
<u>Bacillus megatherium.</u>	
<u>Bacillus polymixa.</u>	
<u>Bacillus sphaericus.</u>	
<u>Bacillus subtilis.</u>	
<u>Bacterium globiforme.</u>	
<u>Corynebacterium flaccumfaciens.</u>	Marchitamiento bacteriano.
<u>Corynebacterium helvolum.</u>	
<u>Micrococcus spp.</u>	
<u>Pseudomonas fluorescens.</u>	
<u>Pseudomonas phaseolicola.</u>	Añublo del halo.
<u>Pseudomonas syringae.</u>	Mancha parda bacteriana.
<u>Xanthomonas phaseoli.</u>	Añublo bacteriano común.
<u>Xanthomonas phaseoli</u> var. <u>fuscans</u>	Añublo bacteriano fusco.

VIRUS QUE ATACAN AL FRIJOL EN AMERICA LATINA. (Ellis y Gálvez 1979).

Virus del mosaico común del frijol.	BCMV.
Virus del mosaico occidental del frijol.	Cepa del BCMV.
Virus del mosaico sureño del frijol.	BSMV.
Virus del mosaico rayado del tabaco.	Cepa del nudo rojo.
Virus del mosaico del pepino.	CMV.
Enrollamiento de las hojas del cerezo.	-----

- e). Debido a la baja rentabilidad de éste cultivo su producción se lleva a cabo en parcelas pequeñas, lo cual ocasiona que el uso de tecnología sea muy limitado.
- f). Las labores culturales por lo regular no se realizan oportunamente lo que genera que el control de plagas y enfermedades sea deficiente, provocando que las malezas compitan con el cultivo por luz, humedad y nutrientes y generando un microambiente apto para el desarrollo de plagas y enfermedades.

III.3.1. LAS ENFERMEDADES DEL FRIJOL MAS COMUNES EN MEXICO.

En México son numerosas las enfermedades que atacan al frijol, destacando entre las de origen fungoso las siguientes: Chahuixtle o roya provocada por Uromices phaseoli, la Antracnosis de la cual es responsable Colletotrichum lindemthianum y la pudrición radicular ocasionada por Fusarium solani, Fusarium phaseoli y Rhizotocnia solani.

Entre las enfermedades de origen bacteriano más comunes en nuestro país destacan las siguientes: el Tizón común Xanthomonas phaseoli, el Tizón de halo Pseudomonas phaseolicola y la Marchitez bacterial Corinebacterium flaccumfaciens.

Dentro de las enfermedades producidas por virus destacan el Mosaico común del frijol, el Mosaico Amarillo, el Mosaico Dorado y el Arrugamiento.

III.3.2. PRODUCCION Y CERTIFICACION DE SEMILLAS EN MEXICO.

Las variedades modernas de frijol y de otros granos básicos que se emplean en México surgen de los programas de fitomejoramiento que vienen funcionando de manera continua desde 1943.

En 1954 se multiplicaron los campos de producción de semillas de variedades mejoradas lo cual generó la necesidad de establecer un control de calidad de semillas y su certificación, creándose para ello el Departamento de Semillas de la Dirección General de Agricultura. Posteriormente PRONASE se originó por la fusión de la Comisión Nacional Del Maíz y el Departamento de semillas; surgiendo también el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) (Molina et al. 1990).

En el periodo de 1942 a 1985 se liberaron de los programas de fitomejoramiento, 667 variedades mejoradas de más de 25 especies de plantas cultivadas y forrajeras. De este total 507 variedades fueron de 9 cultivos básicos y de estos 152 variedades fueron de trigo, 130 de maíz, 82 de frijol y 27 de arroz. De las 82 variedades liberadas de frijol 30 variedades fueron de temporal, 26 de riego y 26 de riego y temporal (Molina et al. 1990).

En México solo el 8% de la superficie total sembrada de frijol se

hace con semilla certificada. Para la producción nacional de éste tipo de semilla PRONASE participa con cerca del 30 % de la producción, los organismos particulares con el 40% y el sector social con el 30% (Molina et al. 1990).

En 1987 la producción total de semilla certificada para diversos cultivos fué de 320,000 ton y en 1988 decreció a 297,000 ton, ambas cantidades insuficientes para cubrir las necesidades totales. Esta tendencia a disminuir la producción de semilla certificada está aumentando alarmantemente, lo cual está generando un incremento en el empleo de semilla no certificada y en la importación de mayores cantidades de otras.

Para 1994 se proyecta incrementar el porcentaje de cubrimiento de la superficie programada de los cultivos básicos con semilla mejorada certificada, pasando del 35% global que se cubrió en 1989 al 49%. En 1989 se produjeron 12,357 toneladas de semilla certificada de frijol con la cual se cubrieron 205,959 hectáreas de un total de 2'284,966 lo cual representó el 9% de la superficie destinada a este cultivo. Para 1994 se proyectan producir 21,048 toneladas de semilla certificada con la cual se cubrirán 350,000 hectáreas de un total proyectado de 2'338,005, lo que representará el 15% de la superficie total proyectada para este básico (Molina et al. 1990).

La política de Modernización implicará un cambio en las funciones y la estructura del Sistema Nacional de Producción, Certificación y Comercialización de Semillas, lo cual se traducirá en una apertura para los productores y los campesinos para que participen en forma organizada en la producción de semillas certificadas de las variedades mejoradas por el INIFAP. Para poderse llevar a cabo esto será necesario la participación de técnicos y profesionistas capacitados en la producción de semillas, y dar estímulos a las empresas de iniciativa privada y a los centros de investigación para desarrollar variedades mejoradas y producir semillas certificadas de calidad en cantidades crecientes y de esta manera disminuir las importaciones.

III.4. LIMPIEZA DEL MATERIAL PROPAGATIVO.

Tanto la urgencia de erradicar a un agente patógeno como la necesidad de generar material propagativo limpio estarán determinadas por la importancia del organismo fitopatógeno, la cual a su vez está dada por las pérdidas económicas que genera. La magnitud de estas pérdidas depende de su frecuencia así como de la severidad del daño que ocasiona durante cada ciclo de cultivo.

Los virus son patógenos que pueden afectar el crecimiento, el aspecto y la producción de las plantas de interés agrícola (Over De Linden and Elliot 1971). La intensidad con que los virus afectan a una variedad depende de la naturaleza del virus, de la tolerancia o resistencia de la variedad a ese virus y de las condiciones ambientales. En la mayoría de las enfermedades causadas por virus pueden intervenir varios componentes virosos, los cuales al estar

presentes de manera individual en una planta pueden ser tolerados y ser asintomáticos, pero cuando se presentan juntos pueden presentar una reacción severa (Hartman y Kester, 1977).

La presencia de virus puede corroborarse por varios métodos:

1. por inspección visual, lo cual se puede realizar cuando los síntomas producidos por la infección son identificables.
2. Por medio de Catalogación; la cual se lleva a cabo por medio de un injerto hecho sobre una planta sana y susceptible a determinado tipo de virus, del cual se sospecha su presencia en el material a injertar; cuando se realiza este tipo de prueba es importante tomar en cuenta la temperatura ya que los síntomas tienen efectos marcados en rangos determinados.
3. Por medio de la técnica de indexación, la cual consiste en inocular una planta herbácea sana (Indexador) con savia de la planta de la cual se desea determinar el estado sanitario y observar los síntomas.
4. Los virus se pueden detectar por medio de técnicas inmunológicas como los ensayos ELISA, de los cuales resultan diagnósticos muy precisos.

La limitante de estos métodos es que son específicos para algunos virus y no permiten detectar a todos los posibles virus patógenos presentes en una planta (Hartman y Kester, 1977; Dodds, 1985).

Los virus se dispersan por medio de vectores como insectos, dentro de los cuales están los áfidos y los saltones de hoja; o bien, por medio del injerto natural entre las raíces de árboles cercanos, por medio de los granos de polen y a través de materiales propagados asexualmente (Hartman y Kester 1977). Algunos virus pueden transmitirse por medio de las semillas (Hu and Wang, 1983).

Para evitar la diseminación de virus y agentes patógenos en general se deben observar una serie de precauciones en el manejo de los materiales propagativos y evitar que estos entren en contacto con materiales contaminados.

Existen dos clases de materiales propagativos dependiendo del grado de limpieza: El material libre de enfermedades, en el cual la enfermedad no se manifiesta debido a que está controlada, y el material libre de patógenos en el cual el agente causante de la enfermedad ha sido erradicado de la planta (Hartman y Kester 1977).

Cada día aumenta el número de especies vegetales en las cuales se aplican programas de erradicación de patógenos y control fitosanitario; algunos de estas son: papa, fresa, cítricos, vides, manzanos, perales, nogales, claveles, crisantemos, gladiolos, lirios, rosales, orquídeas y algunas especies de Prunus de ornato entre otros.

Un programa de Certificación y producción de materiales propagativos libres de enfermedades requiere que se observen los siguientes puntos:

1. La fuente del material propagativo debe ser portador de las características Tipo y debe estar libre de patógenos graves.
2. El material propagativo debe ser manejado con los cuidados necesarios para evitar su infección o alteración genética.
3. La propagación y la distribución se deben realizar bajo normas de calidad que permitan que el material llegue limpio y oportuno al agricultor (Hartman y Kester 1979; Flores 1992).

III.4.1. SELECCION DE FUENTES DE MATERIAL PROPAGATIVO.

Para seleccionar una fuente adecuada del material propagativo se deben tomar en cuenta los siguientes puntos:

1. Selección de plantas que sean uniformes y genéticamente fieles al Tipo. No deben presentar alteraciones genéticas o síntomas de enfermedad alguna.
2. El segundo paso consiste en catalogar, indexar o detectar por medios inmunológicos la presencia de virus o patógenos; si las pruebas dan resultados negativos podrán ser usadas para propagar materiales.
3. El tercer paso consiste en "limpiar" el material de patógenos no detectados, lo cual puede realizarse con la aplicación de técnicas como la selección de partes no infectadas, el cultivo de puntas meristemáticas, el tratamiento con calor de baja intensidad por períodos prolongados, el tratamiento con calor de alta intensidad por períodos cortos, tratamiento químico del material de propagación, cultivo de plantas apomícticas, y por medio de tratamientos combinados de calor y cultivo del ápice de la rama (Hartman y Kester 1977).

Aproximadamente la mitad de los virus fitopatógenos conocidos, especialmente los pequeños y esféricos pueden ser inactivados por termoterapias (Hu and Wang 1983). Este tratamiento combinado con el cultivo "in vitro" de meristemas ha demostrado ser uno de los métodos más eficientes para la limpieza de materiales propagativos.

III.4.2. MANEJO DEL MATERIAL PARA PROPAGACION.

La producción de materiales propagativos de alta calidad requiere de una serie de pasos, en los cuales se van estableciendo diversas calidades, las que a su vez dependen de la cercanía con el material

de propagación de origen y de los propósitos a los que es destinado el material propagativo producido en cada etapa.

Una plantación que es mantenida como fuente primaria de las propagaciones subsiguientes se le denomina **Bloque Básico** y debe ser manejado en condiciones que impidan su contaminación y que permitan detectar cualquier alteración significativa con respecto al Tipo original. Una característica importante de este material es que debe ser un reservorio de material sano y limpio, fiel al tipo y no debe ser en sí mismo fuente directa de materiales de propagación.

Una plantación que mantiene material sano como fuente de propagación comercial se le denomina **Bloque Madre**. Este material puede tener su origen en el Bloque Básico o iniciarse directamente con material limpio.

Para que el material de propagación del Bloque Madre se mantenga sano y libre de patógenos es necesario que se observen los siguientes puntos:

1. El material debe estar aislado de agentes contaminantes.
2. El material debe ser manejado bajo estrictas medidas de sanidad y ser sometido a inspecciones constantes.
3. Se deben realizar pruebas periódicas en este material para detectar a tiempo síntomas de contaminación, lo cual se podrá realizar por medio de inspecciones visuales, por catalogación, por indexación o por pruebas de diagnóstico inmunológicas (Hartman y Kester, 1977).

El material comercial derivado del bloque anterior se le denominará **Material Certificado** y deberá ser generado bajo la supervisión de una oficina legalmente autorizada, ya que por lo regular es el material que se hace llegar a los agricultores.

III.5. PUREZA GENETICA, PRODUCCION Y CERTIFICACION DE SEMILLAS.

El objetivo principal de un sistema de certificación de semillas es proteger las cualidades genéticas de un cultivo y la importancia de un programa de certificación de semillas es permitir el incremento en la disponibilidad de semillas en condiciones tales que se conserve su identidad genética y pureza; así como su limpieza y calidad fitosanitaria (Hartman y Kester 1975; Flores 1992).

Para otorgar la certificación debe existir una oficina legalmente reconocida que :

1. Señale las normas de producción que garanticen la pureza genética de la semilla.

2. Determine la elegibilidad de cultivares específicos.
3. Reglamente condiciones de aislamiento, detección de plantas fuera del Tipo y la calidad de semilla cosechada.

III.5.1. CALIDAD DE LA SEMILLA.

Al igual que para los materiales propagativos asexuales en los que se tienen diversas calidades, las cuales dependen de su cercanía con la **Planta Madre** y de las técnicas con las que fueron generadas; para la producción y certificación de semilla se establecen las siguientes calidades:

a. **Semilla Original.** Es la semilla que procede directamente de la selección y cruza. Es la fuente original de todos los materiales y clases certificadas.

b. **Semilla Básica** deriva directamente de la semilla original y el objetivo de esta calidad es el de mantener las más altas normas de identidad genética y pureza, lo cual es muy importante dado que de aquí van a surgir las demás calidades certificadas. Esta semilla puede servir también para producir cantidades adicionales de semilla original.

c. **Semilla Registrada**, ésta semilla puede proceder tanto de semilla básica o de semilla registrada y debe ser producida bajo normas aprobadas por la oficina de certificación, la cual debe dar fé de la identidad genética y pureza del material.

d. **Semilla Certificada**, puede derivar de semilla original, de semilla registrada o de semilla certificada. Esta semilla es la que se vende al agricultor y por lo tanto debe mantener un alto grado de pureza y de identidad genética. La semilla certificada puede ser de primera o segunda generación.

III.5.2. PRODUCCION DE SEMILLA DE FRIJOL LIBRE DE PATOGENOS POR LA TECNICA TRADICIONAL.

Quando se compara la siembra de semilla infectada producida por los agricultores con la obtenida de semilla limpia, la diferencia en producción es significativa, siendo mayor en esta última en un 37%. En Guatemala la semilla limpia junto con el uso de otros insumos aumentó los rendimientos a 1.5 tons/ha en 84 hectáreas de dos localidades, en comparación con el rendimiento promedio nacional de 515 kg/ha. Sin embargo en Colombia no se obtuvieron los rendimientos esperados al sembrar semillas certificadas y tratadas e incluso la productividad obtenida fué menor que la de los productores locales y en el mejor de los casos la diferencia solo fué superior en 106 kg/ha (CIAT 1979), lo cual indica que esta técnica por sí sola no garantiza incrementos en la productividad.

El uso de semilla libre de patógenos en regiones cultivadoras de

frijol que tienen una incidencia alta de enfermedades debe combinarse con otras medidas de control para disminuir su ocurrencia. Cuando se emplean semillas libres de patógenos las diferencias en rendimiento deben ser altamente significativas para compensar los costos de implantación y mantenimiento de los programas de producción y certificación de semilla limpia. En las regiones semiáridas del occidente de los E.E.U.U. se ha cultivado semilla limpia y esto ha ayudado a disminuir significativamente la incidencia de la antracnosis y del añublo bacteriano; sin embargo esto incrementa los costos debido a que se requiere de (Sanders y Schwartz 1979):

1. Regiones específicas donde no se pueda desarrollar el patógeno, pero donde la planta se desarrolle bien.
2. Aumento en los costos de irrigación, supervisión, protección química y transporte de la semilla limpia a las regiones de producción comercial.
3. Distribución oportuna a los agricultores.

El éxito de un programa de producción de semilla limpia dependerá de la ayuda financiera del gobierno o de una cooperativa de agricultores a fin de disminuir los costos de la semilla y asegurar la aceptación por parte de los agricultores. Sin embargo el uso conjunto de semilla limpia y otras prácticas de control pueden ser una manera económica y efectiva para controlar ciertos patógenos (CIAT 1979).

En la tabla N° 3 se da la técnica empleada por el CIAT para producir de 10 a 100 g de semilla libre de patógenos.

III.5.3. MULTIPLICACION DE LA SEMILLA DE FRIJOL LIBRE DE PATOGENOS EN EL CAMPO.

La producción en campo de semilla de frijol libre de patógenos debe realizarse en parcelas localizadas en regiones que sean desfavorables para la supervivencia, desarrollo y diseminación de los patógenos. Idealmente la pluviosidad deberá ser de 300 mm anuales, una humedad relativa diaria inferior al 60%, una temperatura diaria entre los 25 y 30°C y se debe contar con facilidades de riego por gravedad. Esta región deberá estar localizada en regiones donde no se cultive el frijol ni ninguna otra leguminosa. Las semillas deben sembrarse a una distancia de 20 a 30 cm y la distancia entre surcos debe ser de un metro. Las

Tabla N° 3.

Técnica empleada por el CIAT para producir de 10 a 100 g de semilla libre de patógenos; (CIAT, 1974-1975).

1. La semilla de cada ciclo se siembra en macetas de 20 cm de diámetro por 25 cm de profundidad; se ponen dos semillas por maceta; cada una llenada previamente con sustrato estéril. Las macetas se colocan en un invernadero o en una casa de malla muy fina.
2. Las plantas son regadas con mucho cuidado para evitar el contacto físico entre ellas. Se hacen observaciones diarias para detectar cualquier anomalía o síntoma de enfermedad. En caso de encontrarse una planta afectada se registra la información y se esteriliza inmediatamente el recipiente, la maceta y el sustrato
3. Las plantas que sobreviven se manejan con cuidado extremo para evitar su contaminación y se observan diariamente para detectar cualquier anomalía.
4. Las plantas se evalúan serológicamente y se cosechan por separado para evitar la contaminación, especialmente de virus latentes portados por la semilla.
5. La semilla libre de patógenos se almacena a menos de 10°C, 13% de humedad relativa y en recipientes sellados.

plantas deben ser inspeccionadas al menos una vez por semana durante el ciclo de crecimiento para eliminar oportunamente aquellas que muestren síntomas de enfermedad; siendo críticos los siguientes periodos para la detección de enfermedades:

1. A los 15 días después de la germinación para el virus del mosaico común.
2. A los 30 días para el añublo común, la mancha foliar angular y la mustia hilachosa.
3. A los 45 y 60 días para el añublo común, la mancha foliar y el antracnosis.

El nivel ideal de tolerancia para cualquiera de los patógenos del frijol que se transmiten por semilla es del 0% pero cuando se produce semilla en condiciones tropicales se acepta como nivel de tolerancia el 0.5-1.0 % de infección.

Es importante un manejo adecuado de la semilla en el campo en el momento de la maduración y cosecha. Las aplicaciones foliares de químicos entre 7 y 10 días antes de la maduración de la planta, reducen la infección de las vainas ocasionadas por patógenos o por organismos saprófitos. Se deben cosechar las vainas que no han estado en contacto con el suelo. Las vainas deben ser cosechadas y trilladas con cuidado para evitar resquebrajaduras y la semilla debe almacenarse en condiciones adecuadas. Es recomendable realizar pruebas serológicas de la semilla para cerciorarse de que está libre de patógenos (Hagborg et al. 1950; Mackie et al. 1945; Yerkes y Crispin 1950; CIAT 1974-1975).

La fecha de cosecha es muy importante en la producción de semilla libre de agentes patógenos (Ellis et al. 1976; Rena y Vieira 1971). El dejar las plantas por periodos largos en el campo después de la cosecha hace que aumente la infección por hongos y que disminuya la germinación de la semilla (Ellis et al. 1976). Por lo tanto es importante cosechar inmediatamente después de la maduración del frijol las parcelas destinadas a la producción de semilla limpia. En algunas variedades de frijol el contacto de las vainas con el suelo puede aumentar los niveles de infección por hongos en la semilla, tales como; Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii y Macrophomina phaseolina, lo que generará que el porcentaje de germinación disminuya. (Ellis et al. 1976; Zaumeyer and Thomas 1957).

La forma de cosechar, trillar o sembrar la semilla de frijol pueden afectar la viabilidad, la germinación y la contaminación de esta por microorganismos (Dickinson and Boettger 1976; Schweitzer 1972).

La limpieza de la semilla de frijol se ve también afectada por las condiciones de almacenamiento. López y Christensen (1962) señalan que el contenido de humedad de la semilla del frijol en almacenamiento debe ser del 13% y que esto debe realizarse en lugares con una humedad relativa menor al 75%. López y Crispin (1971) encuentran que la temperatura óptima de almacenamiento debe

ser menor a 10°C.

III.6. GENERALIDADES DE LA TÉCNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Desde 1970 el cultivo de tejidos vegetales empieza a aportar contribuciones significativas a la agricultura y la industria (Murashigue 1978; Zenk 1978).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales (CTV) comprende las siguientes tecnologías (Evans 1989):

La propagación clonal o micropropagación.

La variación gametoclinal.

La variación somaclonal.

La selección "in vitro" de células mutantes.

La fusión de protoplastos.

El cultivo de células en suspensión y la síntesis de productos secundarios.

La propagación clonal o micropropagación es una tecnología que permite propagar "in vitro" varias especies de plantas (Murashigue 1978). En varios casos esta técnica consiste en poner brotes apicales o axilares estériles en medios de cultivo que inducen la formación de más brotes. En términos generales la micropropagación es una técnica asexual de multiplicar plantas a partir de tejidos diploides que son cultivados en medios artificiales y controlando las condiciones ambientales como la luz, la temperatura, la humedad relativa y la composición del medio (Flores 1992). La propagación clonal a partir de brotes apicales se usa actualmente como un método de rutina para producir plantas ornamentales (Oglesby 1978). Una ventaja de esta técnica es la de generar clones ya que mantiene las características de las plantas progenitoras sin alteración permitiendo la producción de plantas uniformes y de alta calidad.

El evento más relevante en el cultivo de tejidos vegetales es la propagación clonal. Murashigue (1977) estima que más de 600 especies de plantas ornamentales han sido propagadas clonalmente. Dentro de la propagación clonal una línea muy empleada en agricultura es la producción de plantas libres de patógenos. En la actualidad son muchas las especies que se pueden producir libres de patógenos (Murashigue 1978), y el cultivo de tejidos vegetales juega un papel muy importante en la fitopatología (Dodds y Roberts 1985).

La variación somaclonal consiste en regenerar plantas a partir de callos derivados de fragmentos de hoja o de protoplastos. Esta técnica se diferencia de la propagación clonal en que genera variantes (Evans y Sharp 1986). La regeneración de plantas a partir de callos se ha asociado con la producción de plantas aneuploides, plantas estériles y variantes morfológicas. La observación de que tanto en papa (Shepard 1982) como en caña de azúcar (Larkin and Scowcroft 1981) las variantes somaclonales producen plantas que presentan resistencia a enfermedades que no estaban presentes en la planta original, sugiere que la producción

de esta variabilidad puede ser de utilidad en agricultura. El valor de la variación somaclonal estriba en la capacidad de recobrar a altas frecuencias nuevas variantes genéticas con características deseables. Durante el curso de un programa somaclonal existen dos pasos de selección muy importantes para recobrar plantas regeneradas (R_1) adecuadas para ser usadas en un programa de cruces:

El primero es el medio de cultivo y el protocolo de regeneración los cuales seleccionan células que muestren capacidad para regenerar plantas.

El segundo paso de selección se realiza en el invernadero permitiendo la identificación de aquellas plantas regeneradas que son capaces de llegar a la floración, la fructificación y la producción de semillas. Esta selección elimina las plantas R_1 con información genética deletérea, de aquí que la población analizada en el campo es más apta para un desarrollo rápido de variedades (Evans 1990).

La variación gametoclinal consiste en regenerar plantas haploides a partir de gametos masculinos y femeninos. El valor de la variación gametoclinal descansa en que reduce el tiempo requerido para obtener líneas homocigias de plantas que pueden ser empleadas en programas de mejora genética dando como resultado la producción rápida de nuevas variedades. Kasha and Reinbergs (1980) han reportado que el uso de haploides dobles reduce el tiempo para liberar una variedad nueva de cebada de doce años a cinco. Las plantas haploides de interés agrícola han sido obtenidas por métodos convencionales como el cultivo de anteras, de óvulos y de polen. Debido a que cualquiera de los métodos da los mismos resultados, se escoge aquel que brinda la mayor frecuencia de regeneración o de producción de haploides.

No obstante la cruce de haploides ha producido relativamente pocos cultivares estables, esto es debido principalmente a la baja frecuencia de aparición de nuevos genotipos de importancia agrícola. Actualmente esta técnica presenta un avance importante en China (Loo 1982).

La selección "in vitro" de células mutantes.

El cultivo de células vegetales ha resultado muy útil para el aislamiento de mutantes y su subsecuente regeneración (Flick 1983). Las mutantes pueden regenerarse e incorporarse directamente a programas genéticos o bien las líneas de células mutadas pueden ser útiles en el establecimiento de líneas de células marcadas bioquímicamente y estables para la fusión de protoplastos o captura de ADN. Las mutantes usadas como marcadores genéticos deberán idealmente tener lesiones genéticas que sean recesivas para permitir la identificación de células modificadas como variantes corregidas.

Las variantes dominantes pueden ser útiles en la selección de modificaciones genéticas que confieran resistencia a productos químicos tóxicos.

La fusión de protoplastos es una vía que hace posible la obtención de híbridos que sería imposible obtener por hibridación sexual. La limitante de esta técnica es la regeneración del híbrido somático a partir del protoplasto (Evans 1983).

Por medio de esta técnica se han obtenido híbridos somáticos interespecíficos en los siguientes géneros: Datura, Daucus, Nicotiana, Petunia, Brassica, Medicago y Solanum. En muchos de los casos los híbridos han sido obtenidos por la fusión entre especies compatibles sexualmente y no han sido incorporados a programas convencionales de fitomejoramiento. Se han producido híbridos intergenéricos y de estos se han obtenido plantas aneuploides y anormales morfológicamente.

El cultivo de células en suspensión y la obtención de productos secundarios. Esta técnica se basa en la capacidad de las células vegetales para producir químicos útiles; dentro de los cuales se pueden mencionar sustancias antimicrobianas, alcaloides antitumorales, saborizantes para alimentos, edulcorantes, vitaminas, insecticidas y enzimas. Sin embargo las células vegetales no pueden competir con el cultivo en lote de bacterias y levaduras debido a los costos de producción.

Algunos productos secundarios solo pueden ser producidos por las plantas y tener un valor agregado muy alto. A escala comercial, las diferencias fisiológicas entre las células vegetales y los microorganismos limita el uso de sistemas de fermentación bacteriana en células vegetales.

El mayor reto de ésta técnica es el de seleccionar líneas celulares altamente productivas. Esto último es posible gracias al uso de la tecnología de la variación somaclonal conjuntamente con los métodos de clonación de agregados celulares desarrollados por Yamada y Fujita (1983).

La clonación de agregados celulares es una técnica del cultivo de tejidos vegetales que permite la identificación de células con capacidades biosintéticas para un metabolito secundario (Yamada y Hashimoto 1982).

Estos métodos han dado como resultado un incremento espectacular en la inducción y selección de líneas altamente productivas.

Todas las tecnologías comprendidas dentro del Cultivo de tejidos vegetales tienen como punto común que en todos los pasos del proceso se requiere de medios de cultivo; ya sea que se empleen para la regeneración de plantas o bien para el mantenimiento y multiplicación de las células, la proliferación de los brotes o el callo.

El medio de cultivo para estas técnicas contiene sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos y amidas, suplementos orgánicos, carbón, fuentes de carbono, reguladores osmóticos, agua, una matriz del medio y las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (SRCV) (Dodds y Roberts 1985). Estas últimas permiten la manipulación de la expresión biológica de las células o de los explantes en cultivo.

III.6.1. LAS SUSTANCIAS REGULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

De gran importancia son las Sustancias Reguladoras del Crecimiento Vegetal (SRCV), ya que son un grupo de sustancias orgánicas que influyen en procesos fisiológicos a bajas concentraciones. Los procesos sobre los cuales influyen las SRCV son el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo; aunque también pueden estar implicadas en la regulación de otros procesos como son la apertura y cierre de estomas (Davies 1987).

Las SRCV naturales pueden ser sintetizadas en diversos tejidos o células y pueden actuar a distancia o en el mismo sitio de síntesis. La característica común de las SRCV es que son compuestos que a bajas concentraciones tienen la capacidad de afectar procesos fisiológicos en las plantas. Estas concentraciones están muy por debajo de aquellas a las que los nutrientes y las vitaminas pueden afectar estos procesos (Davies 1987).

El efecto producido por cada uno de los diversos grupos de SRCV ha sido aclarado por medio de bioensayos y aplicaciones exógenas. Por lo regular las SRCV no actúan solas, sino que lo hacen en conjunción; de tal manera que la expresión final de crecimiento representa el efecto neto del balance entre las SRCV participantes (Leopold 1980).

Las SRCV comprenden los siguientes grupos: Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Etileno y Acido Abscísico y actualmente se ha propuesto la incorporación de las poliaminas dentro de este tipo de sustancias debido a las características regulatorias que presentan (Davies 1987).

Las Auxinas.

La auxina principal en muchas plantas es el ácido indol-3-acético (AIA). Algunos compuestos que sirven como precursores del AIA también tienen actividad auxínica, entre estos está el indolacetaldehído. Algunas plantas sintetizan otras sustancias que muestran una actividad auxínica débil, como es el caso del ácido fenilacético. El AIA puede estar en forma conjugada como en el AIA aspartato y el 4-cloro-AIA.

Existen otras sustancias sintéticas no metabolizables que muestran actividad auxínica como son el ácido indolbutírico, el ácido naftalenacético y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (este último es un herbicida); los cuales junto con el AIA son ampliamente utilizados en el cultivo de tejidos vegetales.

El AIA se sintetiza a partir del triptofano y la síntesis se lleva a cabo en la hoja primordia, en las hojas jóvenes y en las semillas en desarrollo.

El transporte de las auxinas se realiza de célula a célula y cuando se dirige a la raíz probablemente lo hace por medio del floema.

Los efectos más generales de las auxinas son los siguientes:

- Elongación celular y crecimiento del tallo.
- Estimula la división celular en el cambium, y la promueven en combinación con las citocininas en cultivo de tejidos vegetales.
- Diferencian tanto al xilema como al floema.
- Iniciación de la raíz, inducen a la formación de raíces en segmentos de tallo y raíces laterales en fragmentos de raíz cultivadas "in vitro".
- Regulan tropismos de brotes y raíz bajo estímulos de gravedad y luz.
- Dominancia apical. Las auxinas suplen la represión de la yema apical sobre las yemas laterales cuando ésta es suprimida.
- Senectud de hojas. Las auxinas detienen la caída de hojas.
- Abscisión de frutos y hojas. Las auxinas pueden inhibir o promover la abscisión de frutos y hojas dependiendo de tiempo y la posición de la fuente.
- Formación y crecimiento del fruto en algunas especies.
- Maduración de frutos. Detienen la maduración de los frutos.
- Floración. Las auxinas promueven la floración en algunas especies.
- Crecimiento de partes de la flor.
- Promueven la síntesis de etileno.

Giberelinas (AG)s.

Todas las giberelinas están relacionadas con la estructura ent-giberelano. La giberelina más ampliamente utilizada es el AG₃, el cual es producto de un hongo. En las plantas el AG₁ es la giberelina más importante, siendo responsable de la elongación del tallo. Muchos AG_s son precursores de las formas activas de AG_s como son el AG₁ y el AG₂₀. El AG se sintetiza a partir del ácido mevalónico en tejidos jóvenes del brote y en semillas en desarrollo. Se desconocen los sitios exactos de síntesis tanto en la raíz como en el brote. El transporte del AG se realiza por el floema y el xilema.

Los efectos más característicos de las (AG)_s son:

- El AG₃ genera hiperelongación del tallo ya que promueve tanto la elongación como la división celular.
- Causa la elongación del tallo en respuesta a días largos.
- Induce la germinación en semillas que requieren de estratificación o luz para activar este proceso.
- Estimula la producción de numerosas enzimas como es el caso de la alfa amilasa en los granos de cereales en proceso de germinación.
- Induce la formación y crecimiento de frutos, lo cual puede ser inducido por la aplicación exógena en los ovarios de las flores de algunas especies.
- Reversión de la expresión sexual masculina en flores deciduas.

Las Citocininas.

Son derivados de la Adenina y se caracterizan por la capacidad de inducir la división celular (en presencia de auxinas). La citocinina más común en plantas es la Zeatina. Las citocininas pueden estar presentes en forma de ribósidos y ribótidos. La síntesis de citocininas se hace a través de la adenina, lo cual ocurre en los ápices de raíces y en semillas en desarrollo. El transporte de éstas sustancias se realiza por el xilema desde la raíz al brote.

Los efectos de las citocininas son:

- En cultivo de tejidos vegetales induce la división celular en presencia de las auxinas. "In situ" ésta función es natural.
- Morfogénesis. En cultivo de tejidos vegetales y en la agalla de la corona induce a la formación de brotes.
- Crecimiento de las yemas laterales. La aplicación exógena de citocininas libera a las yemas laterales de la dominancia apical.
- Inducen expansión foliar como resultado solo de la elongación celular. Este fenómeno podría ser un mecanismo regulatorio entre la expansión foliar y radicular.
- Detiene la caída de hojas.
- En algunas especies aumenta la apertura de los estomas.
- Induce al desarrollo de los cloroplastos, la aplicación de citocininas genera la acumulación de clorofila y promueve la conversión de los etioplastos en cloroplastos.

El Etileno ($C_2 H_4$).

Se sintetiza a partir de metionina en muchos tejidos como respuesta al stress. Se mueve por difusión desde su sitio de síntesis. Un intermediario muy importante es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico el cual puede ser translocado.

Los efectos del etileno son los siguientes:

- Libera de la dormancia.
- Estimula el crecimiento y diferenciación del brote y la raíz.
- Estimula la formación de raíces adventicias.
- Induce a la abscisión de frutos y hojas.
- Induce la reversión sexual en flores deciduas femeninas.
- Induce la apertura de la flor.
- Participa en la senectud de flores y hojas.
- Induce la maduración del fruto.

El Acido Abscísico (AAB).

Se pensaba que actuaba como un inhibidor ya que las aplicaciones exógenas pueden inhibir el crecimiento de las plantas. En la actualidad se sabe que el AAB actúa más como un promotor por ejemplo en el almacenamiento de proteínas de la semilla. Este regulador se sintetiza a partir del ácido mavalónico en hojas

maduras y en respuesta al stress de agua. Las semillas también son ricas en AAB el cual puede ser importado desde las hojas o ser sintetizado "in situ". EL AAB es exportado desde las hojas y transportado por el floema. Existe la evidencia de que puede circular hacia las raíces en el floema y regresar al brote por el xilema.

Los efectos del ácido abscísico son los siguientes:

- Cierre de estomas. La carencia de agua incrementa los niveles de AAB el cual cierra los estomas.
- Induce el transporte de fotosintatos hacia las semillas en desarrollo y su subsecuente captura por los embriones en crecimiento.
- Induce el almacenamiento de proteínas en semillas.
- Contrarresta el efecto de la giberelina sobre la síntesis de la alfa amilasa en granos de cereales en germinación.
- Puede afectar la inducción y mantenimiento de la dormancia en semillas y yemas.

III.6.2. ERRADICACION DE VIRUS Y PATOGENOS POR MEDIO DEL CULTIVO IN VITRO DE MERISTEMOS.

Esta técnica consiste en sembrar en medios asépticos el domo apical solo o con un par de primordios (Hollings, 1965). Debido a que la parte superior del meristemo está libre de virus es posible cultivarlo asepticamente y generar material libre de patógenos (Dodds, 1985).

Para la técnica de propagación clonal Murashigue (1974) establece tres estados en el proceso de producción de plantas por esta técnica, los cuales son:

- I. Establecimiento "in vitro" de los explantes.
- II. Brotación Múltiple.
- III. Formación de raíz "in vitro".

Las ventajas que se obtienen en el empleo de esta forma de propagación son:

- 1.- Rapidez de multiplicación.
- 2.- Uniformidad de las plantas producidas.
- 3.- Uniformidad genética de los materiales producidos.

La técnica de Cultivo de Tejidos vegetales aplicada a programas de erradicación de virus ha resultado ser una herramienta muy útil ya que el cultivo de meristemas permite obtener plantas libres de virus, de hongos y de otros patógenos (Street, 1971).

Estas ventajas la hacen una técnica idónea para ser aplicada en la

producción de plantas que presentan problemas de viabilidad de semillas, plantas provenientes de cruza muy controladas y líneas que pueden ser regeneradas asexualmente y que requieren del establecimiento de materiales "Madre" de alta calidad fitosanitaria (Flores 1992)

El Cultivo de Tejidos Vegetales junto con otras técnicas asexuales de propagación se emplean para propagar líneas clonales utilizadas en la producción de semillas (Evans 1989).

Morel y Martin (1952) demuestran la eliminación de virus y patógenos de la *Dahlia* y la papa al sembrar in vitro el meristemo apical.

El cultivo de meristemas puede ser combinado con el tratamiento con calor de baja intensidad por periodos prolongados (Hollings and Stone, 1968). En muchos casos el tratamiento con temperaturas entre los 34-36°C dá como resultado la inactivación de los virus sin ningún efecto sobre las plantas. Aproximadamente la mitad de los virus conocidos de las plantas, particularmente los virus pequeños esféricos pueden ser inactivados por medio de tratamientos con calor (Hu and Wang 1983). EL tratamiento con calor durante la fase de crecimiento de las plantas donadoras puede dar como resultado la producción de meristemas más grandes que los de plantas no tratadas (Mullinet et al. 1974).

En algunos casos el tratamiento con calor es esencial para eliminar virus. En Chrysanthemum el 98.5% de las plantas micropropagadas quedaron libres de virus cuando las plantas donadoras fueron tratadas con calor; y por el contrario solo el 15% de las plantas fueron libres de virus sin el tratamiento con calor (Hollings et al. 1972). El tratamiento con calor también puede ser aplicado al incubar los explantes en altas temperaturas (Walker and Cooper 1975).

Debido a que en algunos casos la erradicación de virus por medio del cultivo de meristemas no es efectiva, se requiere que se realicen pruebas de indexación o de detección de virus por medios inmunológicos en las plantas micropropagadas (Dodds 1985; Giles y Morgan 1987).

Otra técnica que permite la obtención de materiales libres de virus es la regeneración de plantas a partir de Callos y del cultivo de células en suspensión (Chandra y Hildebrandt, 1967). Esto es debido a que en las células en cultivo existe una mitosis rápida y no hay tejido vascular diferenciado.

La infección viral puede ser erradicada totalmente de los callos y de cultivos de células en suspensión por medio de subcultivos continuos. Las plantas regeneradas a partir de tejidos no infectados de hoja pueden servir también para generar plantas libres de virus. Murakishi y Carlson (1976) regeneraron plantas a partir de zonas no infectadas de hoja de tabaco con el virus del mosaico. Las zonas no infectadas se caracterizaron por ser de color

verde oscuro. Aproximadamente el 50% de las plantas regeneradas fueron libres de virosis.

El proceso de regeneración in vitro puede ser llevado a cabo por dos rutas que son : la ruta de organogénesis directa y la ruta de embriogénesis somática.

El proceso de regeneración por la ruta de organogénesis directa consiste en generar órganos directamente a partir de las células del explante cultivado o bien a partir de callos; estos órganos pueden ser brotes, raíces o ambos.

Los factores que favorecen la organogénesis no son fáciles de discernir ya que el estímulo puede implicar componentes del medio, compuestos endógenos producidos por el explante o el cultivo y substancias llevadas por el explante original; (Thomas and Davey, 1975).

El subcultivo prolongado del callo induce cambios en las células; los cuales incluyen la habituación y la friabilidad; (Thorpe, 1980). La organogénesis es controlada por un balance entre auxinas y citocininas; una proporción alta de auxinas/citocininas induce a la formación de raíces en callos de tabaco, mientras que una proporción baja favorece la formación de órganos (Skoog y Miller, 1957).

La regulación más precisa en la formación de órganos ha sido obtenida a partir de capas delgadas de células epidérmicas y subepidérmicas (Tran Than Van, 1980 a,b).

La organogénesis a partir de callos empieza con la formación de un grupo de células meristemáticas denominadas meristemoides capaces de producir un primordio (Ross, Thorpe and Costerton, 1973).

III.6.3. PROPAGACION CLONAL EN Phaseolus vulgaris.

Kueneman (1976) reportó el cultivo de meristemas de Phaseolus vulgaris. Los domos apicales de 0.5 mm obtenidos de semillas sometidas a imbibición durante 4 días fueron cortados y cultivados asépticamente en el medio de Gamborg (B5) al cual se le añadió ácido naftalen acético (ANA) y 6-bencil adenina (BA). A la concentración de 1×10^{-6} M de ANA se promueve el surgimiento de raíces mientras que 0.2×10^{-6} M de BA las inhibe.

Allavena y Sharp (1981) cultivaron in vitro brotes apicales de Phaseolus vulgaris en el medio de Murashigue y Skoog (MS) adicionado con $20-40 \times 10^{-6}$ M de BA en combinación con $2-50 \times 10^{-6}$ M de ANA. Obtuvieron elongación de tallos y el surgimiento de raíces cuando transfirieron los brotes generados al medio B5 suplementado con 0.45×10^{-6} M de BA.

Kartha et al. (1981) estudiaron la regeneración de algunas leguminosas. Sembraron meristemas que median entre 0.4 y 0.5 mm con

tejido subyacente y un par de primordios foliares. El explante fué cultivado asepticamente en el medio de MS y las vitaminas B5, al cual se le adicionaron ANA y BA en varias concentraciones y combinaciones.

El ANA a la concentración de 1×10^{-6} M indujo a los meristemas a desarrollarse en plantas vigorosas. En combinaciones de ANA y BA no hubo regeneración de plantas completas.

En concentraciones de $1-10 \times 10^{-6}$ M de BA ó ANA y BA (10 y 5×10^{-6} M) respectivamente, se generaron brotes múltiples.

La BA a una concentración de 0.1×10^{-6} M regeneró un brote único de 2 a 3 cm de largo el cual al ser transferido a un medio que contenía BA, ANA y ácido giberélico (GA_3) a las concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.1×10^{-6} M respectivamente, produjo raíces.

Rubluo y Kartha (1984) reportaron la regeneración del meristemo apical de Phaseolus vulgaris cuando fué cultivado en el medio MS y las vitaminas de B5, suplementado con 10×10^{-6} M de BA o ácido indol acético (AIA) ó ácido indol butírico (AIB).

Los explantes fueron cultivados a una temperatura constante de 26°C . Reportaron que las plantas crecieron, florecieron y fructificaron normalmente una vez adaptadas a suelo.

III.6.4. EMBRIOGENESIS SOMATICA Y MORFOGENESIS.

La embriogénesis somática es un proceso de regeneración in vitro de plantas, en el cual se genera una estructura proembrionaria a partir de células diploides. Los embriones somáticos pueden generarse a partir de tres fuentes de estas células; (Kohlenbach, 1978).

1. Células vegetativas de plantas maduras.
2. Tejidos reproductivos diferentes al cigoto.
3. Hipocotilos y cotiledones de plantas jóvenes sin pasar por estadios de callo.

Sharp et al. (1980) sostienen que la embriogénesis somática se puede inducir de dos maneras :

1. En ausencia de callo, a partir de células determinadas preembrionicamente programadas para la diferenciación embriónica.
2. Pasando por callo, y los embriones se originan de células embriogénicas inducidas en este callo.

Existen dos eventos críticos en la formación de un embrión somático. El primero es la iniciación de las células embriónicas y el segundo es el subsecuente desarrollo de éstas células para constituir un embrión. El primer evento requiere de un medio específico denominado de inducción el cual se caracteriza por contener altas concentraciones de auxinas. El segundo evento se

lleva a cabo en un medio con bajas concentraciones de auxinas. Este medio también puede servir para el desarrollo posterior de la planta (Ammirato, 1983).

Los factores químicos más importantes en el medio de inducción de embriones son las auxinas y el nitrógeno reducido. Tanto en el medio de inducción como en el medio de desarrollo se requiere de cantidades elevadas de nitrógeno reducido el cual puede ser proporcionado en forma de NH_4Cl y KNO_3 . El primero de estos compuestos puede ser remplazado por glutamina, ácido glutámico, urea y alanina (Ammirato, 1983).

Las formas orgánicas de nitrógeno a bajas concentraciones son más efectivas que los compuestos de nitrógeno inorgánico en la inducción de embrioides.

Las poliaminas parecen ser requeridas para la inducción de la embriogénesis en cultivo de células de zanahoria ya que al añadir putresina y espermidina o espermina se restituye la capacidad embriogénica antes disminuida al haberse aplicado un inhibidor de la arginino descarboxilasa (Feirer et al. 1984).

La adición de carbón activado puede favorecer la embriogénesis ya que absorbe sustancias inhibitorias (Ammirato, 1983).

El embrioides debe pasar por estadios progresivos de desarrollo embrionario conocidos como: globular, acorazonado y torpedo. El embrión así formado, al ser transferido a un medio de cultivo adecuado generará una plántula similar a la obtenida a través de una fecundación normal. Esta plántula será capaz de adaptarse a condiciones de cultivo en suelo, desarrollarse y completar su ciclo.

Los embriones somáticos se pueden desarrollar tanto de callos como directamente del explante original, esto último sin implicar ningún paso intermedio de callo. A esta forma de generación de embriones se le denomina embriogénesis directa y es la que puede ser utilizada más eficientemente para aplicaciones biotecnológicas.

Como sistema de multiplicación masiva de plantas, la embriogénesis somática presenta limitantes debido a que induce frecuentemente los fenómenos de Variación Somaclonal y de Habitación (Thorpe 1980). El primero de estos se caracteriza por elevar la tasa de mutación de las células inducidas a la calogénesis, con lo cual se reduce su eficiencia como sistema de propagación clonal; aunque en la actualidad es un sistema que se emplea con mucho éxito en algunas especies para obtener nuevas variedades.

El fenómeno de habituación consiste en la pérdida gradual o en algunos casos inmediata de la capacidad a diferenciarse y regenerar plantas de las células inducidas a la calogénesis. Este fenómeno se agudiza conforme aumenta el número de transferencias a que son sometidas las células en estado indiferenciado.

La embriogénesis somática sucede más eficientemente en cultivos

nuevos y esta propiedad decrece conforme se incrementa la edad del cultivo (Reinert et al. 1977).

La embriogénesis somática empleada como herramienta para la generación de plantas transgénicas tiene como limitante; el que aún son pocas las especies en las que se pueden obtener embriones somáticos de manera sistemática y reproducible.

Existen especies en las cuales es relativamente sencillo producir embriones somáticos como es el caso de la zanahoria, el tabaco y el rosal; pero existen otras especies vegetales catalogadas como recalcitrantes, para las cuales aún no se cuenta con un protocolo de regeneración por esta vía; entre estas están el frijol y el maíz.

III.6.5. EMBRIOGENESIS SOMATICA EN Phaseolus vulgaris.

Crocomo et al. (1976) cultivaron secciones de hoja en el medio de Veliky y Martin (1970) adicionado con AIA 11.2×10^{-6} M, ANA 5.4×10^{-6} M y Cinetina 0.9×10^{-6} M. Al medio se le añadió extracto de semillas de frijol (1/4 de semilla/ml) de medio. Se obtuvo la regeneración de dos plantas y los resultados no fueron reproducibles.

Sharp et al. (1984) reportaron que Rosetti y Allavena obtuvieron embriogénesis somática a partir de secciones de hoja de Phaseolus vulgaris sembrados en el medio B5 adicionado con 18×10^{-6} M de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). A los 20 días el callo producido en este medio fué transferido a medio líquido en agitación. Este medio fué adicionado con 0.53×10^{-6} M de ANA, 2.3×10^{-6} M de cinetina, 0.29×10^{-6} M de GA y 0.11×10^{-6} M de ácido abscísico (AAB). Después de 10 a 12 días de cultivo en este medio se produjeron pocos embriones que no se desarrollaron en plantas.

Tonin et al. (1982) cultivaron fragmentos de hoja en el medio MS adicionado con cinetina 28.5×10^{-6} M y tres aminoácidos (arginina 0.34 mM, ácido aspártico 0.37 mM y cisteína 0.08 mM) y solo obtuvieron regeneración de raíces.

Crocomo et al. (1976) descubrieron un efecto estimulante de la Zeatina en un rango de concentración de $0.2-0.4 \times 10^{-6}$ M en la morfogénesis de raíz.

Jeffs y Northcote (1979) encontraron zonas de diferenciación en callo inducido en un medio suplementado con 2,4-D, AIA, sacarosa y otros disacáridos como la trealosa y la maltosa. Reportaron que el AIA induce a la mitosis y que las células jóvenes tienden a diferenciarse por el efecto de la sacarosa la cual produce elongación celular en presencia del AIA residual.

Bevan y Northcote (1979) encontraron que al agregar agua de coco a un cultivo de células en suspensión de Phaseolus vulgaris se incrementó el número de transferencias en las cuales se podía inducir diferenciación de raíces y nódulos vasculares; impidiéndose el fenómeno de habituación.

Mariotti et al. (1989) reportaron la regeneración de plantas de Phaseolus vulgaris a partir de secciones del entrenudo del brote apical. Estos explantes fueron cultivados en el medio de MS al cual se le añadió 1×10^{-6} M de cinetina. Los tejidos fueron previamente transformados con un vector derivado de Agrobacterium.

McClellan y Grafton (1988) regeneraron plantas de frijol a partir de nodos cotiledonarios de plántulas de semillas que fueron germinadas en medio MS suplementado con 5×10^{-6} M de BA. Los nudos fueron subcultivados en el mismo medio originándose la producción de brotes múltiples que surgieron de la región de unión del cotiledón con el epicotilo y ocasionalmente en el extremo terminal de este mismo fragmento.

Los brotes fueron enraizados y llevados a plantas que produjeron semillas viables.

Kamal et al. (1990) obtuvieron plántulas de Phaseolus vulgaris a partir de peciolo con porciones de lámina de hoja, tomados de plantas germinadas en el medio de MS y las vitaminas de B5 adicionado con 5×10^{-6} M de BA.

Los explantes se desarrollaron en plantas que se adaptaron a condiciones de cultivo en suelo y produjeron flores y vainas con semillas aparentemente normales.

III.6.6. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.

Las células en suspensión son agregados celulares o células dispersas creciendo en un medio líquido que se encuentra en constante agitación.

El cultivo de células en suspensión se establece a partir de tejido friable denominado callo, o bien, a partir de tejidos disgregados de plántulas o embriones. Un medio que produce callos friables capaces de ser fragmentados sin dificultad, proporciona una masa celular que se romperá fácilmente al ser transferida al medio líquido y que permanecerá dispersa en este.

Un cultivo de células en suspensión se origina por medio de un "evento crítico azaroso" que ocurre durante el inicio de la exposición de las células vegetales al medio líquido. Las células que sufren esta transición en el metabolismo y en la velocidad de crecimiento producen lo que se denomina una "línea celular". Algunas de las características de una línea celular son las siguientes (King, 1980):

1. Un alto grado de separación celular.
2. Una morfología celular homogénea.
3. Un citoplasma denso y un núcleo distintivo.
4. Gránulos de almidón.
5. Pocos elementos traqueoides.
6. Tiempos breves de duplicación celular (24-72 hr).
7. Pérdida de la totipotencialidad.
8. Habituaación a las SRCV.

9. Incremento en los niveles de ploidía.

Los medios son mantenidos en agitación para que los agregados se distribuyan y para que exista un adecuado intercambio gaseoso (Street, 1977). El rango de velocidad más favorable para propiciar un buen crecimiento celular está comprendido entre las 100 y 120 rpm para un matraz de 250 ml y que contiene un volumen de medio equivalente al 20 % de esta capacidad. (Thomas y Davey, 1975).

El inicio del cultivo en suspensión requiere de una cantidad - elevada de callo, lo cual se estima entre 2 y 3 g/100ml de medio de cultivo (Hegelsson, 1979).

La densidad inicial de células debe estar comprendida entre $0.5-2.5 \times 10^5$ células/ml; esta densidad se elevará aproximadamente a $1-4 \times 10^6$ células/ml al final del periodo de incubación.

Existe una densidad celular mínima por debajo de la cual el cultivo no crecerá; este valor mínimo se estima que queda comprendido en el rango entre $9-15 \times 10^3$ células (Street, 1977).

Para tomar en cuenta un medio de cultivo para células en suspensión es necesario considerar los cambios de pH producidos por el inóculo; el cultivo siempre se establece en un rango entre 4.8- 5.4 y con el tiempo, debido al crecimiento celular tiende a incrementarse a 7.0.

La complejidad del medio para cultivo de células en suspensión está en relación inversa con el tamaño del inóculo; a inóculos más pequeños los requerimientos nutricionales son más complejos. pero la composición del medio puede alterar las características de friabilidad de las células.

El crecimiento de las células del cultivo en suspensión comprende fases bien definidas las cuales son (Street 1977):

1. Fase Lag.
2. Fase de crecimiento exponencial.
3. Fase de crecimiento lineal.
4. Fase de retardamiento progresivo .
5. Fase estacionaria.

Para mantener la viabilidad del cultivo las células deben ser subcultivadas en la fase estacionaria temprana, es decir; al momento de alcanzar la densidad celular máxima; esto se alcanza en la mayoría de los cultivos entre los 18 y 25 días y para cultivos con crecimiento muy activo entre 6 y 9 días (Street, 1977). En varias ocasiones se hace necesario el filtrar el cultivo a través de una malla de nylon o de acero para eliminar los agregados celulares grandes.

Existen varios métodos para determinar el crecimiento del inóculo, entre los cuales están las siguientes:

1. Volumen de células.
2. Peso celular fresco.

3. Peso celular seco.
4. Proteína total.

En términos generales no existe un procedimiento estandarizado para empezar un cultivo en suspensión a partir de callo; es necesario proceder por medio de ensayo y error hasta lograr las condiciones óptimas (King y Street 1977).

IV. JUSTIFICACION.

De los antecedentes arriba mencionados se desprenden las siguientes observaciones:

1. La técnica tradicional de producción de semilla limpia de Phaseolus vulgaris presenta el inconveniente de no poder garantizar la ausencia total de patógenos.
2. Parece haber suficiente evidencia de la relación entre el incremento de la productividad de los cultivos y la ausencia de patógenos portados en los materiales propagativos.
3. Existen hasta la fecha una serie de pruebas que acreditan que la propagación clonal o micropropagación a partir del cultivo de meristemas, callos o células en suspensión pueden ser empleadas con el objeto de producir materiales propagativos limpios y de alta calidad y uniformidad.
4. En México al igual que en América Latina la proporción de semilla certificada libre de patógenos empleada en la producción de básicos, por ejemplo, en frijol es muy baja. Esto hace evidente la necesidad de implementar técnicas eficientes que incorporadas a los programas de "Certificación" optimicen y garanticen la limpieza de los materiales propagativos que se hacen llegar al sector agrícola productivo.
5. Otra estrategia eficiente para erradicar patógenos es la generación de variedades resistentes, y varias de las tecnologías comprendidas en el cultivo de tejidos vegetales han mostrado ser herramientas eficaces para alcanzar este objetivo. La limitante para lograr este propósito, sobre todo en las variedades mexicanas de Phaseolus vulgaris, es el establecimiento de protocolos de regeneración tanto por la vía organogénica como por la embriogénica.

Con base en todo lo anterior y debido a la importancia que el Frijol tiene como cultivo alimenticio en México, se hace imperante la necesidad de desarrollar protocolos de regeneración que permitan:

- I. El establecimiento de un Modelo de Producción y Certificación de Semillas, que optimice y garantice la producción de material propagativo sexual libre de patógenos y que pueda ser adaptado a las condiciones reales de cultivo en nuestro País.
- II. El establecimiento de las técnicas de regeneración en Frijol para contar con un Modelo de estudio y experimentación en aspectos de diferenciación e Ingeniería genética.

V. OBJETIVOS.

V.1. OBJETIVO GENERAL.

Establecer las técnicas de regeneración de Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa a partir del cultivo in vitro de diversos explantes.

V.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

Establecer la técnica de regeneración de Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa a partir de brotes apicales para obtener plantas libres de enfermedades virales y libres de hongos y bacterias sistémicas.

Establecer la técnica de regeneración de Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa a partir de meristemas apicales y axilares para obtener plantas libres de virus y de otros patógenos.

Incorporar las dos técnicas de Micropropagación anteriores a un esquema modelo de Certificación Fitosanitaria de semillas.

Determinar las condiciones que inducen callogénesis y las condiciones de cultivo de células en suspensión de Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa, como antecedente para el establecimiento de las técnicas de cultivo de células en suspensión y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos.

VI. MATERIALES Y METODOS.

VI.1 Medios de Cultivo.

El medio base empleado fué el de Murashigue y Skoog (MS) el cual se modificó en los siguientes componentes: vitaminas Murashigue y Skoog, y las vitaminas del medio de Gamborg (B5); se le adicionó extracto de semillas de frijol, el cual fué añadido tanto cocido como crudo.

De las fuentes de carbono se probaron la sacarosa; la cual fué agregada sola, la maltosa y la glucosa; las que fueron añadidas de manera combinada.

Las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal empleadas comprendieron auxinas, giberelinas y citocininas, las cuales fueron incorporadas en concentraciones que abarcaron el rango de (0.01-10.0 mg/L). En el grupo de las auxinas fueron probados el ácido indol 3- acético (AIA), el ácido naftalen acético (ANA) y el ácido 2,4-dicloro fenoxi acético. Dentro de las citocininas se ensayaron la 6-Bencil aminopurina (6BAP ó 6BA) y la 6- furfuril aminopurina (Cinetina). El ácido giberélico empleado en estas pruebas fué el (AG₃).

Estos componentes fueron adicionados de manera individual o en combinaciones de dos y tres. En el esquema N°1 se indican las variaciones de medios de cultivo empleadas a lo largo de estas pruebas.

Se probó el efecto del sulfato de adenina como factor sinérgico en una concentración de 125 mg/L.

Para las pruebas de regeneración a partir del cultivo de meristemas, brotes apicales, callogénesis y organogénesis directa, los medios de cultivo fueron sólidos por lo que se complementaron con agar a una concentración de 0.8%, pero para las pruebas de proliferación de células para regeneración por la ruta de embriogénesis somática así como para el establecimiento de células cultivadas en suspensión, los explantes se desarrollaron en medio líquido el cual fué mantenido en agitación.

En la tabla N°4 se especifican los componentes y las concentraciones empleadas en la preparación de los medios de cultivo ensayados a lo largo de estas pruebas.

VI.2. Método de esterilización de las semillas.

Para la esterilización de las semillas se empleó el siguiente método:

- a.- Lavado de las semillas con detergente.
- b.- Enjuague con agua corriente.
- c.- Inmersión en hipoclorito de sodio (Cloralex) al 12.5-50% durante 10 minutos.
- d.- Enjuague con agua destilada estéril cuatro veces.

Tabla 4.

COMPONENTES DEL MEDIO MURASHIGUE Y SKOOG/ VITAMINAS B5.

Compuesto	mg/l.
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Na_2EDTA	33.6
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Acido Nicotínico	1
Piridoxina HCl	1
Tiamina HCl	10
Myo Inositol	100
Sacarosa	30,000
Agar	8,000
pH	5.6

- e.- Inmersión en alcohol etílico al 90% durante 1 minuto.
- f.- Inmersión en hipoclorito de sodio (Cloralex) al 12.5% durante 10 minutos.
- g.- Enjuague con agua destilada estéril cuatro veces.

Una variación de este sistema de esterilización consistió en introducir entre los pasos b y c un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 1 minuto, enjuague con agua destilada y suprimir los pasos e y f. Las semillas que presentaron testas desteñidas y arrugadas después de estos tratamientos fueron descartadas.

VI.3. Condiciones de germinación in vitro.

Para la germinación in vitro de las semillas se emplearon dos tipos de medio; El primero fué el medio de MS con las vitaminas de B5, al cual se le agregó sacarosa al 30%, y agar al 0.8%; el segundo fué agua estéril sobre un sustrato de algodón.

En ambos tipos de soporte se agregaron auxinas(2,4-D y ANA); citocininas (6-BA Y Cinetina) ó giberelinas(GA₃); en concentraciones comprendidas dentro del rango de 0.1-10.0 mg/l y en el caso de la Cinetina y la 6-BAP el rango probado fué de 1 a 27.5 mg/l. Esto fué realizado con el propósito de interrumpir el programa hormonal portado por los embriones.

Para cada una de las pruebas de regeneración, las semillas fueron germinadas tanto en condiciones de total obscuridad como en condiciones de iluminación, bajo un fotoperiodo de 12/12. En todas las pruebas la temperatura se mantuvo constante a 26°C.

En el esquema N°2 se muestra las combinaciones realizadas para la germinación de las semillas de las cuales surgieron las plantas donadoras de explantes.

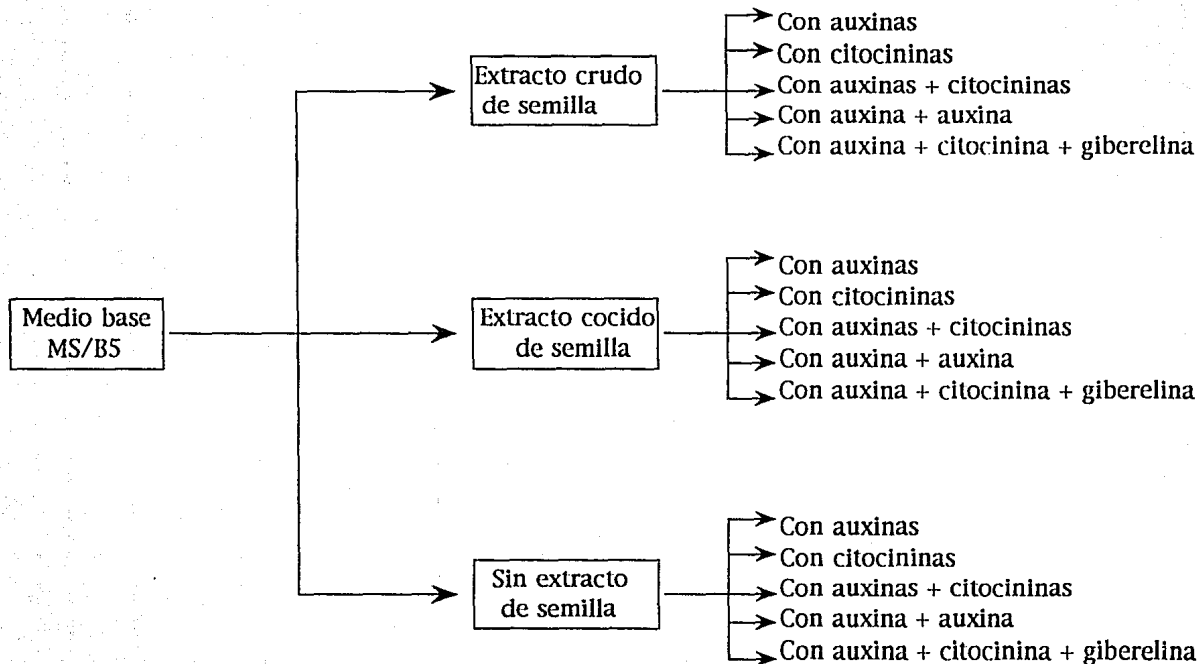
VI.4. Disección de los explantes.

Los explantes fueron tomados de plántulas de 7 días de edad o bien que poseían una raíz que medía aproximadamente de 3 a 4 cm de longitud.

Se disecaron los siguientes explantes: meristemos con un par de primordios, yemas apicales, entrenudos cotiledonarios, nudos cotiledonarios con yemas y sin ellas, segmentos de hipocotilos a diferentes longitudes, diversas porciones de radícula, cotiledones y embriones de diferentes edades. En el esquema N°3 se especifican los explantes empleados en las pruebas de cultivo "in vitro".

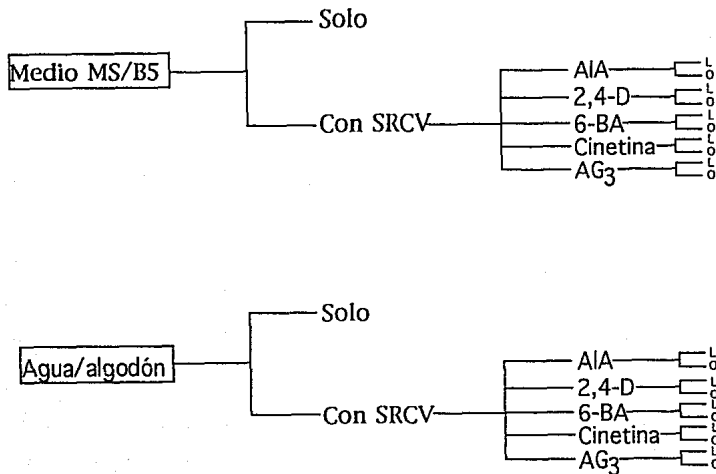
Esquema de pruebas realizadas "in vitro"

Variaciones en los
Medios de cultivo



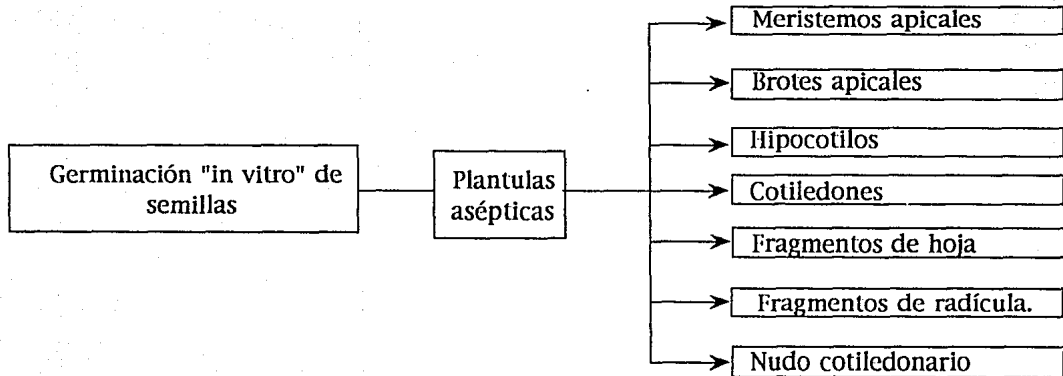
Esquema Nº 1. Medios de cultivo empleados en las pruebas realizadas "in vitro".

Esquema de condiciones de germinación "in vitro"



Esquema Nº 2. Diversas condiciones de germinación de semillas para obtener los explantes empleados en las pruebas "in vitro". SRCV= sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. AIA= ácido indol-3-acético. 2,4-D= ácido 2,4-dicloro fenoxiacético. 6-BA= 6-bencil adenina. AG= ácido giberélico. L= luz. O=obscuridad.

Esquema de Explantes empleados.



Esquema Nº 3. Obtención de los diversos explantes empleados en las pruebas "in vitro".

nes controladas de intensidad luminosa, fotoperiodo y temperatura. La intensidad luminosa fué de 1000 lux, el fotoperiodo de 12 horas de iluminación por 12 horas de oscuridad y la temperatura se mantuvo a 26°C durante todas las pruebas.

VI.6. Condiciones de desarrollo de las plántulas en suelo.

Las plántulas generadas in vitro fueron desarrolladas en suelo en dos fases sucesivas:

1. Fase de adaptación a suelo .
2. Fase de desarrollo en invernadero.

Para la fase de adaptación a suelo se empleó un sustrato inerte a base de vermiculita y las plántulas fueron sembradas en recipientes individuales y colocadas en una cámara Conviron donde se controló la temperatura a 26°C, la intensidad luminosa fué de 3000 lux, la humedad relativa fué del 70% y el fotoperiodo fué de 12 horas de iluminación por 12 horas de oscuridad. Las plantas fueron regadas y fertilizadas con una solución nutritiva elaborada con las sales inorgánicas del medio de MS.

La fase de desarrollo en invernadero se llevó a cabo sobre un sustrato similar al de la fase anterior, la temperatura del invernadero se mantuvo en 30°C por el día y 16°C por la noche. Las plantas fueron fertilizadas a base de Nitrógeno, Fósforo y Potasio hasta que alcanzaron la etapa de fructificación.

VI.7. Condiciones de cultivo en campo.

Para la valoración de la semilla proveniente de las plantas obtenidas in vitro, se comparó su rendimiento contra semilla comercial y contra semilla producida en invernadero que no provenía de plantas regeneradas. Para esta valoración un lote de semillas fué cultivado a cielo abierto en condiciones de riego, y sin la aplicación de fertilizantes ni plaguicidas. Esto se realizó en la localidad de Mazatepec, Morelos. Otro lote de semilla fué valorado en condiciones de cultivo en suelo bajo invernadero, sin la aplicación de fertilizantes ni plaguicidas en la localidad de Roque, Gto

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

VII.1. Homogenización del material propagativo.

En base a pruebas preliminares realizadas en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, con semillas comerciales de Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa se planteó como primera necesidad el homogenizar el material

propagativo debido a la heterogeneidad de las respuestas obtenidas en estas pruebas.

Para homogeneizar el material se procedió a seleccionar de un lote de plantas provenientes de semillas comerciales una planta, la cual además de mostrar las características tipo era vigorosa y no mostraba síntomas de enfermedades. Esta planta se desarrolló bajo las normas tradicionales de certificación de semillas y a partir de esta se produjeron las semillas necesarias para realizar todas las pruebas de regeneración subsiguientes.

De acuerdo a los objetivos propuestos el desarrollo experimental se dividió en dos vertientes principales; la primera de ellas consistió en el establecimiento de la técnica de micropropagación a partir de brotes apicales y meristemas tanto apicales como axilares, para producir materiales propagativos libres de virus y otros patógenos, con lo cual quedaría establecida la primera etapa del desarrollo de un modelo de programa de certificación fitosanitaria de semillas de frijol.

Debido a que el brote apical de la plántula recién germinada ya constituye en sí la parte aérea de la futura planta, se propuso fuera este el primer tejido a ensayar debido a que solo faltaría regenerar el sistema radicular para constituirlo en una planta completa; al mismo tiempo se estaría en posibilidad de conocer el manejo del meristemo, el cual tendría que pasar por el estadio de brote o brotes en el proceso de regeneración in vitro de plantas; y posteriormente generar raíces capaces de resistir la transferencia a suelo.

La segunda vertiente de regeneración se planteó fuera realizada tanto por la vía de organogénesis directa como por la vía de embriogénesis somática. En el caso de la organogénesis directa se emplearían todos los tejidos de la plántula excepto los brotes apicales y los meristemas, tratando de que de los explantes sembrados se obtuvieran directamente brotes, raíces y posteriormente plantas, sin pasar por fases intermedias de desdiferenciación.

Para la embriogénesis somática se utilizarían todos los tejidos de las diversas secciones de las plántulas incluyendo los brotes apicales y los meristemas; pero pasando por una fase de cultivo in vitro en la cual formarían callo, el cual a su vez sería subcultivado en medio líquido. Las células en suspensión obtenidas en esta última etapa del proceso serían sometidas a condiciones de cultivo que las inducirían a rediferenciarse pasando de los estadios progresivos proembrionarios (globular, acorazonado y torpedo) a plántula y plantas capaces de resistir la transferencia a suelo.

Tanto el proceso de regeneración por medio de la organogénesis directa como el proceso de embriogénesis somática fué dividido en diversas etapas. En los esquemas 4 y 5 se muestran los pasos seguidos en cada una de las rutas empleadas.

Las etapas correspondientes a la organogénesis directa fueron las siguientes:

- a. Etapa de germinación in vitro.
- b. Etapa de crecimiento o multiplicación in vitro.
- c. Etapa de enraizamiento in vitro.
- d. Etapa de adaptación a suelo.

El proceso de regeneración vía la embriogénesis somática se dividió en :

- a. Etapa de germinación in vitro.
- b. Callogénesis.
- c. Proliferación de células en suspensión.
- d. Transferencia a medios embriogénicos.
- e. Diferenciación caulinar y radicular in vitro.
- f. Etapa de adaptación a suelo.

En el cuadro N°5 se exponen las pruebas realizadas, indicando tanto el explante utilizado como las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal empleadas, así como; otros compuestos adicionados al medio.

Cada una de las pruebas fué realizada con tejidos provenientes de plántulas germinadas en luz y en oscuridad.

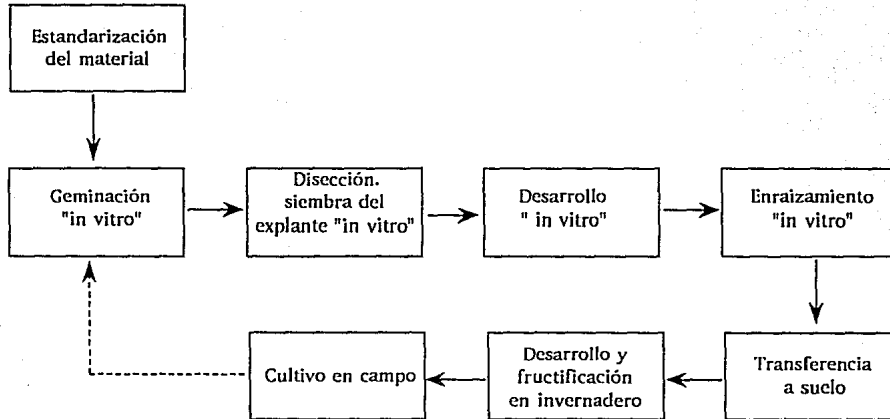
Para las pruebas desde la serie "A" hasta la serie "J" se emplearon tejidos de plántulas provenientes de geminación en 6-BA, GA, ANA y 2,4-D.

Los embriones inmaduros empleados en las últimas pruebas fueron tomados de los siguientes tamaños: Semillas de 0.4, 0.5, 0.7 y 1.0 cm de longitud.

Cada una de las pruebas realizadas se repitió al menos dos veces. Cada repetición se hizo con 10 frascos y en cada frasco fueron sembrados al menos 5 explantes similares.

Esquema general de trabajo

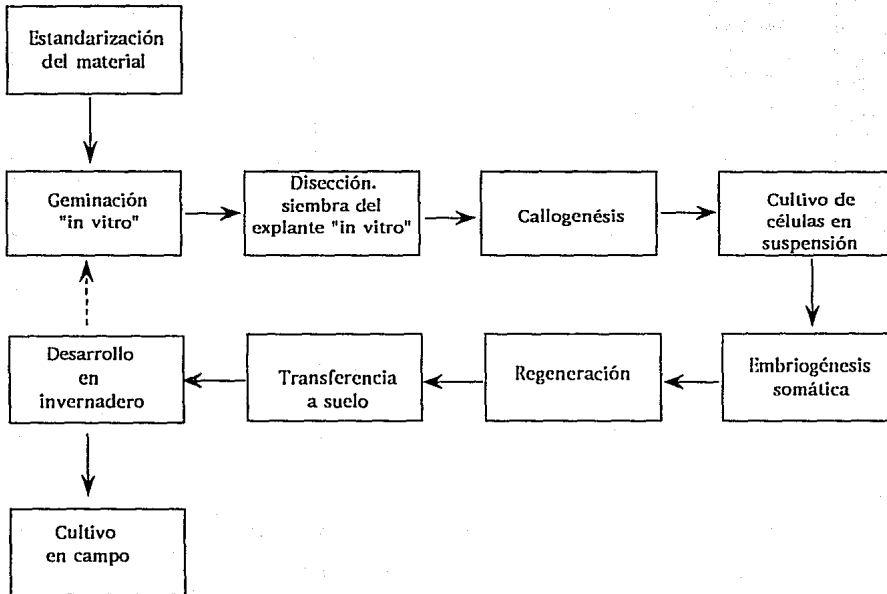
Ruta de organogénesis



Esquema Nº 4. Pasos seguidos en la ruta de regeneración de plantas por organogénesis .

Esquema general de trabajo

Ruta de embriogénesis somática



Esquema Nº 5. Pasos seguidos en la ruta de regeneración de plantas por embriogénesis somática. En el presente trabajo se llegó hasta el paso de cultivo de células en suspensión.

CUADRO DE PRUEBAS REALIZADAS CON DIVERSOS EXPLANTES DE

Phaseolus vulgaris
Variedad Negro Jamapa

Código	Substancias reguladoras del crecimiento vegetal mg/l	Otros	Explante
001-1	BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-2	BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-3	BA(10.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-4	BA(0.1)	Sac., S.Aden.	Mer, B.Apl.
001-5	BA(1.0)	Sac., S.Aden.	Mer, B.Apl.
001-6	BA(10.0)	Sac., S.Aden.	Mer, B.Apl.
002-1	BA(0.1)	Glu/Mal.	Mer, B.Apl.
002-2	BA(1.0)	Glu/Mal.	Mer, B.Apl.
002-3	BA(10.0)	Glu/Mal.	Mer, B.Apl.
002-4	BA(0.1)	Glu/Mal., S.Aden.	Mer, B.Apl.
002-5	BA(1.0)	Glu/Mal., S.Aden.	Mer, B.Apl.
002-6	BA(10.0)	Glu/Mal., S.Aden.	Mer, B.Apl.
003-0	2,4-D(4.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip.
004-0	2,4-D(4.0), Kin(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip.
005-0	Kin(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
005-0	AIA(2.2), ANA(1.0), Kin(0.1)	Sac. Ext. Cru.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
007-0	AIA(2.2), ANA(1.0), Kin(0.1)	Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
007-1	AIA(2.2), ANA(1.0), Kin(0.1)	Sac. Ext. Coc. (NH ₄) ₂ SO ₄ 1g	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
007-2	AIA(2.2), ANA(1.0), Kin(0.1)	Sac. Ext. Coc. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2g	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
007-3	AIA(2.2), ANA(1.0), Kin(0.1)	Sac. Ext. Coc. (NH ₄) ₂ SO ₄ 3g	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
008-1	AIA(2.2), ANA(1.0), BA(0.1)	Sac. Ext. Coc. (NH ₄) ₂ SO ₄ 1g	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
008-2	AIA(2.2), ANA(1.0), BA(0.1)	Sac. Ext. Coc. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2g	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
008-3	AIA(2.2), ANA(1.0), BA(0.1)	Sac. Ext. Coc. (NH ₄) ₂ SO ₄ 3g	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
0701-	AIA(2.2), ANA(1.0), BA(0.01)	Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
0701-	AIA(2.2), ANA(1.0), BA(0.00)	Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07-	AIA(2.2), ANA(1.0)	Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07		Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07-a	ANA(1.0)	Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07-b	AIA(2.2)	Sac. Ext. Coc.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
001-T		Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07-a	6-BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07-b	6-BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
07-c	6-BA(3.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
08-a	Kin(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
08-b	Kin(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
08-c	Kin(3.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
007-a	ANA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.
007-b	ANA(1.0), AIA(2.2)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj. Cot. Hip., l. Cot.

Cuadro Nº 5. Pruebas realizadas con diversos medios de cultivo y explantes a lo largo de este trabajo. Cada una de las pruebas se repitió al menos dos veces. Cada repetición se hizo con diez frascos y en cada frasco fueron sembrados al menos cinco explantes similares.

Clave	Substancias reguladoras del crecimiento vegetal mg/l	Otros	Explante
001-c	AIA(2.2)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj, Cot, Hip., I. Cot.
001-d	ANA(1.0), AIA(2.2), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl. Hj, Cot, Hip., I. Cot.
001-e	BA(0.1), ANA(0.1), GA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-g	GA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-h	BA(0.1), AIA(1.0), GA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-F1	AIA(1.0), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-F2	AIA(1.0), BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-F3	AIA(2.2), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-F4	AIA(2.2), BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-I1	ANA(0.1), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-I2	ANA(0.1), BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-I3	ANA(1.0), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-I4	ANA(1.0), BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-J1	GA(0.1), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-J2	GA(0.1), BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-J3	GA(1.0), BA(0.1)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-J4	GA(1.0), BA(1.0)	Sac.	Mer, B.Apl.
001-K1	ANA(0.1), BA(0.1)	Sac.	Emb. Inmad.
001-J1	GA(0.1), BA(0.1)	Sac.	Emb. Inmad.
001-J2	GA(0.1), BA(1.0)	Sac.	Emb. Inmad.
001-h	BA(0.1), AIA(1.0), GA(0.1)	Sac.	Emb. Inmad.
071-d	BA(5.0)	Sac.	Semilla, Hj, Mer
071-e	BA(10)	Sac.	Semilla
071-f	BA(15)	Sac.	Semilla
071-g	BA(20)	Sac.	Semilla
071-h	BA(22.5)	Sac.	Semilla
071-i	BA(25)	Sac.	Semilla
071-k	BA(27.5)	Sac.	Semilla
071-l	BA(30)	Sac.	Semilla
081-d	Kin(5.0)	Sac.	Semilla, Hj, Mer
081-e	Kin(10)	Sac.	Semilla
081-f	Kin(15)	Sac.	Semilla
081-g	Kin(20)	Sac.	Semilla
081-h	Kin(22.5)	Sac.	Semilla
081-i	Kin(25)	Sac.	Semilla
081-k	Kin(27.5)	Sac.	Semilla
081-l	kin(30)	Sac.	Semilla

Sac= sacarosa, Mal=maltosa, Glu=Glucosa, Ext. Cru= extracto crudo, Ext. Coc= extracto cocido, Mer=meristemo, B.Apl= brote apical, Hj=hoja, Cot=cotiledón, I.Cot=internodo cotiledonario, Emb. Inmad= embrión inmaduro, Hip=hipocotilo, AIA= ácido indol acético, ANA= ácido naftalenacético, GA= ácido giberélico, 6-BA=6-benciladenina, Kin=cinetina, 2,4-D= ácido 2,4-diclorofenoxiacético, S.Aden=sulfato de Adenina.

VIII. RESULTADOS.

VIII.1. FASE DE CULTIVO "IN VITRO".

Los resultados generales de todas la pruebas realizadas "in vitro" a lo largo de este experimento se dan en el cuadro N°2, en el cual se especifican tanto el número de clave del medio de cultivo empleado, así como, el explante utilizado y el resultado obtenido y en el cuadro N°3 se dá un resumen de los resultados más relevantes con respecto a los objetivos propuestos.

Fuentes de carbono.

Los explantes desarrollados en el medio MS adicionado con Maltosa/Glucosa no se desarrollaron. Mostraron una alta tendencia a la clorosis y al necrosamiento. La sacarosa resultó ser la fuente de carbono más adecuada para el frijol.

Sulfato de adenina.

El sulfato de adenina no tuvo efectos promotores ni en presencia de sacarosa ni en presencia de maltosa/glucosa, lo que concuerda con los resultados de Allavena y Rosetti (1986).

Condiciones de iluminación en la germinación.

Los explantes provenientes de semillas que germinaron en condiciones de iluminación respondieron mejor que los que procedieron de semillas germinadas en oscuridad.

Los Brotes Apicales procedentes de plántulas obtenidas en oscuridad mostraron en cultivo "in vitro" un color blanco amarillento y algunos de ellos a los pocos días murieron, mientras que los que sobreviven desarrollan un color verde intenso y una apariencia normal.

A diferencia de los brotes apicales los Meristemos provenientes de plántulas obtenidas en oscuridad responden vigorosamente y en algunos medios empiezan a generar raíces que parten de un callo en la porción basal.

Los brotes apicales provenientes de semillas germinadas en la oscuridad eran de color amarillo y morían a los pocos días de cultivo aséptico, mientras que los brotes tomados de semillas germinadas en luz desarrollaban un color verde intenso y una apariencia sana.

Los meristemos provenientes de semillas germinadas en oscuridad se desarrollan vigorosamente en algunos medios y empiezan a generar raíces que surgen de la porción callosa del explante.

Los internodos cotiledonarios provenientes de semillas germinadas en oscuridad se tornan verdes y generan callo y raíces en uno de los extremos.

Sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

La 6-BA en una concentración de 1.0 mg/l promueve la proliferación de brotes múltiples (8 brotes/ meristemo), con una producción muy escasa de callo en la base.

La 6-BA en una concentración de 10 mg/l y en presencia de maltosa/glucosa produjo brotación múltiple con abundancia de callo en la base. Los brotes tuvieron muy poco desarrollo.

El 2,4-D en concentraciones de 2 a 4 mg/l induce a la callogénesis de casi todos los explantes cultivados; principalmente en fragmentos de hoja, en meristemos, entrenudos cotiledonarios y segmentos distales de hipocotilo.

Extracto de semillas.

En el medio base adicionado con extracto crudo de semilla, AIA 2.2 mg/l, ANA 1.0 mg/l y Kinetina 0.1 mg/l presentó una alta necrosis de los explantes; los cuales mostraron una abundante proliferación de raíces, sobre todo los derivados de hipocotilo. Los meristemos y brotes no mostraron desarrollo. Cuando se substituyó la kinetina por 6-BA la clorosis y la necrosis se agudizó.

En el medio base adicionado con extracto de semilla cocido, AIA 2.2 mg/l, ANA 1.0 mg/l y Kinetina 0.1 mg/l, se indujo la regeneración de 4 plantas por la vía de la embriogénesis directa; hasta la fecha estos resultados no han sido reproducibles.

El medio base adicionado con extracto cocido de semillas y sin ninguna sustancia reguladora del crecimiento vegetal produjo plantas cloróticas que resistieron bien la transferencia a suelo.

El medio base con extracto de semilla, sulfato de adenina, AIA 2.2 mg/l, ANA 1.0 mg/l y kinetina 0.1 mg/l generó una marcada tendencia a la clorosis y al necrosamiento de los explantes; estos síntomas fueron muy notorios en los brotes.

Los tratamientos 0701, 07001 y 070, los cuales además del extracto cocido contenían AIA 2.2 mg/l, ANA 1.0 mg/l y 6-BA 0.1 mg/l produjeron una marcada necrosis, poco enraizamiento y vitrificación en los explantes ensayados.

Los meristemos sembrados en estos medios presentan poco desarrollo y tienden a necrosarse. Los internodos cotiledonarios cultivados en el medio 07 emitieron raíces en un solo extremo. En este mismo sitio se produjo callo.

Los tratamientos 70, 72, 07 y T regeneraron plantas a partir de brotes. Estas plantas se adaptaron bien a condiciones de suelo y se desarrollaron hasta la madurez en el invernadero.

El vigor relativo en el desarrollo en invernadero fué el siguiente:

07>70>72>T.

Medio MS, vitaminas B5 y sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

El medio 001-b mostró un desarrollo vigoroso de los brotes apicales, los cuales poseían un tono verde oscuro, un desarrollo abundante de raíces aunque no produjo el engrosamiento de tallo presentado en 001-a. Las plantas de 26 días obtenidas en el medio 001-b resultaron muy difíciles de transferirse a suelo, debido al desarrollo que presentaron a partir de la segunda semana.

Los meristemas cultivados en las pruebas 001-a y 001-c no mostraron un buen desarrollo. El medio 001-b desarrolló los meristemas en brotes de 2 cm de longitud con emisión de raíces que surgían del callo generado en la base del explante.

El medio 001-1 desarrolla muy bien los meristemas en brotes que poseen una expansión foliar notoria. El brote es elongado y no produce raíces. Se genera un engrosamiento no calloso en la base del brote.

En el medio 001-d los meristemas se desarrollan poco y hay producción de callo en la base del explante, el cual es de color café sin ser necrótico.

Los brotes expanden bien la hoja embrionaria. En la base del tallo se genera un callo del cual emergen raíces gruesas y abundantes.

En el tratamiento 001-I, los meristemas se desarrollan en brotes que resisten bien la transferencia al medio 001-b el cual se empleó como medio de enraizamiento. Una vez enraizadas las plántulas se adaptaron bien a suelo y fructificaron en el invernadero.

Todos los embriones inmaduros se desarrollaron en plántulas con brote caulinar y radicular perfectamente diferenciados en los medios de la serie "I".

Callogénesis y cultivo de células en suspensión.

Los explantes tomados de semillas germinadas en medios con 2,4-D y 6-BA mostraron tener una gran capacidad de generación de callo. Este callo al ser transferido a medio líquido produjo una densidad celular muy elevada.

Los callos generados de hoja se necrosaron más rápidamente en el medio líquido que los callos provenientes de meristemas.

Brotación múltiple "in situ".

Las semillas germinadas en el medio 081-g; y en luz, mostraron mayor elongación del tallo que las de la prueba 071-g; el epicotilo se elongó y presentó vitrificación, no hubo proliferación de brotes a partir de la yema axilar cotiledonaria.

Las semillas germinadas en el medio 071-g en obscuridad generaron

tallos engrosados que se estrangularon por debajo de la zona del nudo cotiledonario. La brotación en la yema axilar cotiledonaria fué muy escasa, desarrollándose solo la yema axilar; los cotiledones se mantuvieron verdes, mientras que la yema apical fué de color amarillo.

Las semillas germinadas en el medio 071-g; y e luz, produjeron brotes múltiples a partir de las yemas del nudo cotiledonario. Las plántulas obtenidas de esta prueba presentaron un tallo muy engrosado y una marcada atrofia en la raíz caracterizada por la ausencia de raíces secundaria y un engrosamiento en la raíz principal, así como un color café muy intenso en esta estructura. Las semillas germinadas en el medio 071-g en obscuridad a las cuales se les extirpó la yema apical mostraron mayor elongación en las yemas axilares y produjeron a partir de éstas un promedio de cuatro brotes/yema "in situ". Las hojas de éstas yemas se expandieron. El tallo fué engrosado y la raíz mostró una atrofia muy marcada y color café.

VIII.2. RESULTADOS EN CAMPO.

Se ha producido semilla de plantas regeneradas a partir de brotes apicales y en este momento se tiene ya la tercera generación de estas semillas, denominadas R_0 , R_1 y R_2 respectivamente.

La semilla R_0 se empleó para producir la segunda generación, al mismo tiempo que se realizó una evaluación del comportamiento de esta primera generación contra semilla comercial en condiciones de invernadero.

La semilla proveniente de plantas regeneradas presenta una germinación muy uniforme y del 100%.

El crecimiento de las plántulas de R_1 es notoriamente más acelerado que el de las semillas comerciales durante las primeras tres semanas; siendo la diferencia en desarrollo del doble en este lapso de tiempo.

La producción de semilla de las plantas R_1 es muy uniforme, las vainas presentan un promedio de siete semillas por vaina y cada una de las semillas es 1.7 a 1.9 veces mas pesada que las semillas de plantas provenientes de semilla comercial.

La semilla R_1 también fué empleada para realizar una valoración en campo vs semilla comercial. El comportamiento observado en el invernadero se vió sobre expresado en el campo ya que además de que la germinación fué del 100% y totalmente uniforme, las plantas mostraron un vigor muy superior a las plantas provenientes de semilla comercial, lo cual se notó principalmente en los siguientes aspectos:

1. Desde el momento de la germinación hasta la cuarta semana las plantas de semilla R_1 se desarrollaron en más del doble que

las plantas procedentes de semilla comercial.

2. Las plantas provenientes de semilla R_1 , de dos y tres semanas de edad, poseían los cotiledones turgentes y verdes; mientras que los cotiledones de las plantas de semilla comercial estaban totalmente colapsados y negros.
3. La floración, la fructificación y el llenado de semillas aventajó en las plantas R_1 por más de tres semanas a las plantas de semilla comercial.
4. Las plantas R_1 se desarrollaron de manera compacta sin tendencia a formar enredadera, mientras que su contraparte comercial hizo enredadera.
5. Las plantas R_1 no mostraron manchas debidas a virus u hongos, mientras que en las plantas de semilla comercial se detectaban varios manchones de plantas infectadas a lo largo del surco.
6. En datos preliminares se obtuvo un estimado de producción por hectárea en el cual las plantas de semilla comercial mostraron una producción de 800 kilos/hectárea, mientras que las plantas R_1 mostraron un rendimiento de 2,700 kilos/hectárea.

La prueba realizada en Roque Gto. en condiciones de invernadero, en el ciclo de Invierno 91-92 no arrojó resultados tan contrastantes como los obtenidos en Mazatepec, debido principalmente a las bajas temperaturas que se registran en la región de Celaya en esta época del año; sin embargo, la diferencia en peso de la semilla proveniente de plantas regeneradas en comparación con la semilla comercial fué superior en un 26%. Aún en condiciones climáticas adversas las diferencias en vigor, uniformidad de germinación y desarrollo en las primeras cuatro semanas fue superior en las semillas de plantas regeneradas.

La prueba realizada en campo en la región de Cortazar Gto en el ciclo de temporal 92 no fué válida debido a la alta humedad relativa registrada en el mes de octubre, la cual se mantuvo y prolongó por más de cuatro días, generando una neblina baja que ocasionó a su vez la proliferación de hongos e insectos que acabaron con el cultivo.

Las plantas provenientes de meristemo se adaptaron a condiciones de cultivo en suelo, florecieron y fructificaron de una manera muy precoz; la floración no fué simultánea sino continua. El llenado de las vainas no fué ni uniforme ni abundante, pero las semillas R_1 producidas germinaron normalmente y generaron plantas vigorosas que florecieron y fructificaron normalmente en condiciones de invernadero generando la progenie R_1 . Esta semilla R_1 proveniente de plantas regeneradas de meristemo está lista para ser valorada en campo, en la actualidad se tienen ya 1500 g que han sido producidos en invernadero y que están siendo probadas en campo en la región de Mazatepec Mor. en el ciclo invierno 92-93, bajo condiciones de riego.

CUADRO 2. RESULTADOS GENERALES DE LAS PRUEBAS "IN VITRO".
(Fase in vitro)

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
001-0	Mer.	El meristemo se desarrolla de 2 a 3 cm. Los primordios se desarrollan pero la yema no se expande. No hay aparición de raíces. Los meristemas se mantienen vivos por bastante tiempo.
001-0	B.Apl.	Todos los brotes sembrados en este medio desarrollan raíces parecidas a las generadas por la cinetina a la concentración de 0.1 mg/l y al desarrollo del brote ocasionado por el AIA a la concentración de 2.2 mg/l.
001-1	Mer.	Desarrollo de un brote único con aspecto normal si el explante procede de plántulas que germinaron en medios sin S.R.C.V. No hay formación de callo, pero se genera un ensanchamiento en la base.
001-1	Mer.	Cuando los meristemas fueron tomados de plántulas que germinaron en medios con AG, tienden a desarrollarse en un brote elongado que presenta expansión foliar. Hay un ensanchamiento no calloso en la base y los meristemas axilares tienden a desarrollarse.
001-1	B.Apl.	Hay una elongación muy marcada del entrenudo. Alta tendencia a la abscisión de la hoja embrionaria. En la base del tallo de la yema se forma un engrosamiento calloso de color café. No hay emisión de raíces.
001-2	Mer.	Proliferación de 6 a 9 brotes múltiples. Producción escasa de callo en la base. Alta tendencia del callo a necrosarse. No hay expansión de las hojas y se presenta desarrollo de la yemas axilares.
001-1	B.Apl.	El desarrollo del brote es menos elongado que en el medio 001-1. Hay abscisión de la hoja embrionaria y en la base del tallo de la yema se forma un abultamiento calloso de color café.
001-3	Mer.	Necrosamiento en la base del meristemo, con desarrollo muy precario del brote.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
001-4	Mer	Muy poco desarrollo del brote, no hay formación de callo en la base pero esta se engrosa, el conjunto presenta vitrificación.
001-5	Mer.	Desarrollo vitrificado y succulento. No hay callo en la base. La hoja primordia se expande.
001-6	Mer.	Desarrollo vitrificado con abundancia de callo en la base que ahoga el brote.
002-1	Mer.	Desarrollo de brote único, no hay formación de callo.
002-2	Mer.	Necrosamiento del brote, no hay formación de callo. Formación de brote único.
002-3	Mer.	Poco desarrollo del brote, sin formación de callo en la base.
002-4	Mer.	Desarrollo del brote. Aparente brotación múltiple acompañada de elongación de hojas. Pequeña producción de callo en la base, la cual se necrosa.
002-5	Mer.	Desarrollo del brote, ausencia de callo.
002-6	Mer.	Brotación múltiple con abundancia de callo en la base. Brotes cloróticos desarrollados.
003-0	Mer,Hj.	Generación de callo algo necrótico.
004-0	Mer.Hj.	Generación de callo muy friable en ambos explantes.
005-0	B.Apl.	Desarrollo del brote con color verde oscuro.
005-1	Mer.	El meristemo se desarrolla pero los trifolios se mantienen en forma de yema. Hay escasa emisión de raíces.
005-1	B.Apl.	El desarrollo del brote es vigoroso y de forma elongada, hay expansión foliar y poca tendencia a la abscisión de la hoja embrionaria y una alta proliferación de raíces.
005-2	Mer.	Hay desarrollo del meristemo, pero los trifolios no se expanden. No hay emisión de raíces.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
005-2	B.Apl.	El desarrollo del brote apical no es tan elongado como en la prueba anterior, ni la expansión foliar tan notoria. Hay formación de callo de color café en la base del tallo de la yema, pero no hay emisión de raíces.
006-0	Hip.	Induce a la formación de raíces en casi todos los explantes ensayados mostrando una alta tendencia al necrosamiento.
007-0	Hip.	Embriogénesis somática de cuatro plantas, experiencia que no se pudo repetir. Cabe mencionar que las plantas se generaron a partir de explantes tomados de plántulas provenientes de semillas que fueron dañadas al momento de realizarse la desinfección, lo cual ocasionó que la testa fuera retirada y por lo tanto la orientación que esta estructura provoca en la radícula quedó suprimida, lo cual provocó que esta surgiera de manera errática y con lesiones en los tejidos externos.
07(2)	Mer.	Plantas cloróticas, raíces gruesas.
0701-	B.Apl.	Generó plantas cloróticas que se desarrollaron bien y soportaron las condiciones de cultivo en invernadero.
07001	B.Apl.	Desarrollo de brote clorótico, las hojas tienden a caerse y la producción de raíz es escasa.
070	B.Apl.	Plantas cloróticas poco desarrolladas y con poca raíz, hojas y tallos muy quebradizos.
070	I.Cot.	Los segmentos de internodo cotiledonario se necrosan y no logran desarrollarse.
070	Hip.	Se desarrollan longitudinalmente; por fuera tienen una apariencia rugosa y seca, pero los tejidos internos poseen células suaves, muy hidratadas y se distingue una alta vascularización. La proliferación de raíces se da en un solo extremo del segmento con producción escasa de callo y en algunos casos se observa la aparición de un brote.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
070	Mer.	El desarrollo de este explante es mayor en este medio que en el 7001 ó en el 70001, pero se detiene al poco tiempo acompañado de necrosis y posteriormente de la muerte del tejido.
008-0	Mer.	Cuando los meristemos proceden de plántulas que germinaron en luz se desarrolla con un callo abundante que tiende a necrosarse. Hay producción de raíces, el desarrollo del brote es bueno pero muy clorótico y con alta tendencia al necrosamiento.
008-0	Mer.	Cuando los meristemos proceden de plántulas que germinaron en obscuridad se desarrolla más callo en la base del meristemo, hay poco desarrollo del brote y de la raíz en comparación con los meristemos que crecen en luz.
008-1	Varios	Esta prueba mostró menor desarrollo que las pruebas correspondientes de la serie 007-1.008-1.
008-2	B.Apl.	Se torna clorótico, no muestra desarrollo y se necrosa.
008-3	B.Apl.	En este medio hay ausencia total de desarrollo y el necrosamiento se presenta a los pocos días de cultivo "in vitro".
008-3	Mer.	Este explante se necrosa a los pocos días de ser cultivado en este medio.
TT	Mer.	Cuando el meristemo se desarrolla en obscuridad se genera un brote no expandido que detiene su desarrollo a la tercera semana. Se produce algo de callo en la base. Las hojas más grandes del brote se necrosan.
TT	B.Apl.	Cuando el brote se desarrolla en condiciones de iluminación hay un crecimiento vigoroso de este, mostrando un color verde intenso y con buena formación de raíz, pero con tendencia a producir tallos quebradizos después de la tercera semana.
001-a	Mer.	Callo con emergencia de primordios radiculares.
001-b	Mer.	Callo sin raíces.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
071a	Hip.	Proliferación de raíces con generación de callo friable y de células cristalinas. Se mantiene verde. El interior está constituido por células turgentes y cristalinas.
071b	Hip.	El hipocotilo aumenta en grosor y emite raíces en abundancia, sobre todo en la porción que descansa sobre el medio. El interior son células turgentes cristalinas, no hay tanta raíz como en 071a y hay callo necrótico. El explante se mantiene verde.
071c	Hip.	Se mantiene verde. El interior son células turgentes cristalinas, no hay raíces y hay abundancia de callo necrótico en los extremos.
071	Mer.	Desarrollo clorótico, callo abundante y raíces en la base.
007-1	B.Apl.	Desarrollo abundante de hojas poco cloróticas. Producción de raíces delgadas.
007-1	Hip.	Este tejido desarrolla callo que se necrosa rápidamente, las raíces brotan en todas direcciones y sin control del geotropismo.
007-0	Hip.	Desarrollo longitudinal, las células del interior son suaves y turgentes con alta vascularización. Las raíces solo emergen en un extremo, hay aparición de un brote que no desarrolla.
007-0	Mer.	Desarrolla más que en 7001 ó que en 70001. El crecimiento es lento se detiene y se necrosa.
70001	B.Apl.	Desarrollo poco clorótico, tendencia a la defoliación, poca raíz y algo de vitrificación.
TT	Mer.	Detiene desarrollo a la tercera semana, produce callo en la base. Necrosamiento en hojas grandes.
TT	B.Apl.	Desarrollo de plantas vigorosas, buen color y raíces abundantes. Los tallos se tornan frágiles a la tercera semana.
001-a	B.Apl.	Desarrollo limitado de la parte aérea, buen desarrollo de la raíz.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
071a	Hip.	Proliferación de raíces con generación de callo friable y de células cristalinas. Se mantiene verde. El interior está constituido por células turgentes y cristalinas.
071b	Hip.	El hipocotilo aumenta en grosor y emite raíces en abundancia, sobre todo en la porción que descansa sobre el medio. El interior son células turgentes cristalinas, no hay tanta raíz como en 071a y hay callo necrótico. El explante se mantiene verde.
071c	Hip.	Se mantiene verde. El interior son células turgentes cristalinas, no hay raíces y hay abundancia de callo necrótico en los extremos.
071	Mer.	Desarrollo clorótico, callo abundante y raíces en la base.
007-1	B.Apl.	Desarrollo abundante de hojas poco cloróticas. Producción de raíces delgadas.
007-1	Hip.	Este tejido desarrolla callo que se necrosa rápidamente, las raíces brotan en todas direcciones y sin control del geotropismo.
007-0	Hip.	Desarrollo longitudinal, las células del interior son suaves y turgentes con alta vascularización. Las raíces solo emergen en un extremo, hay aparición de un brote que no desarrolla.
007-0	Mer.	Desarrolla más que en 7001 ó que en 70001. El crecimiento es lento se detiene y se necrosa.
70001	B.Apl.	Desarrollo poco clorótico, tendencia a la defoliación, poca raíz y algo de vitrificación.
TT	Mer.	Detiene desarrollo a la tercera semana, produce callo en la base. Necrosamiento en hojas grandes.
TT	B.Apl.	Desarrollo de plantas vigorosas, buen color y raíces abundantes. Los tallos se tornan frágiles a la tercera semana.
001-a	B.Apl.	Desarrollo limitado de la parte aérea, buen desarrollo de la raíz.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
001-a	Mer.	Formación de callo pequeño en la base, tiende a perderse la anatomía del meristemo.
001-a	B.Apl.	Cuando los brotes provienen de plántulas que germinaron en iluminación, hay un desarrollo limitado de los brotes apicales (2 a 3 cm) con poca expansión foliar. Desarrollo abundante de raíces bastante engrosadas y muy largas con pelos radiculares.
001-b	B.Apl.	Desarrollo muy rápido del brote con una producción abundante de raíces. Este resultó ser el medio para enraizamiento de plantas provenientes de brote apical y meristemas.
001-b	Mer.	Se desarrolla bien con formación de callo en la base del cual emergen raíces. La tendencia al amarillamiento del brote es mínimo. Si las raíces crecen superficiales en el medio de cultivo hay una gran proliferación de pelos radiculares y si se introducen en el medio son gruesas y sin pelos.
001-b	B.Apl.	Si los explantes provienen de plántulas germinadas en iluminación el desarrollo de los brotes es de 8 a 10 cm en 22 días, con un color verde oscuro y con raíz abundante y resistente. Estas plantas soportan muy bien la transferencia a suelo.
001-c	B.Apl.	Hay menor desarrollo que en 001-b, el tallo es muy grueso, el color de las hojas es más claro. Hay abscisión de la hoja embrionaria. Hay producción de raíces largas y con abundancia de pelos radiculares. Hay tendencia al amarillamiento y necrosamiento de las hojas.
001-c	Mer.	Desarrollo con abundancia de callo y emisión de raíz en la parte superior de este callo.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
001-c	B.Apl.	Poco desarrollo del brote en longitud pero con un marcado engrosamiento del tallo. Se genera un color verde claro y la abscisión de la hoja embrionaria es frecuente sin que haya habido expansión de estas. En la base del tallo se forman raíces abundantes y gruesas con una marcada tendencia a la formación de pelos radiculares si se encuentran fuera del medio.
001-d	Mer.	Hay poco desarrollo, se mantienen verdes y se genera callo abundante en la base. Este callo es de color café claro sin ser necrótico y tiene buena apariencia. Las células son pequeñas y cristalinas. De la base del meristemo surgen raíces delgadas.
001-d	B.Apl.	Hay poco desarrollo (2-3 cm), con color verde oscuro. Hay buena expansión de la hoja embrionaria. En la base del tallo se forma callo del cual emergen raíces abundantes y gruesas.
001-e	Mer.	Cuando los brotes son tomados de plántulas que vienen de medios sin S.R.C.V el desarrollo se lleva a cabo con poca expansión foliar. En la base del explante se forma un callo duro en forma de tumoración. En muy pocos brotes hay desarrollo de las hojas.
001-e	Mer.	Si los brotes son tomados de plántulas obtenidas en medios con AG se desarrollan en forma de yema, ninguna presenta expansión foliar. El callo que se forma en la base del explante no es tan grande como en la prueba anterior pero la brotación de las yemas axilares es muy abundante.
001-e	B.Apl.	Presenta muy poco desarrollo, poca expansión foliar, poco desarrollo de callo en la base del explante y tiende a amarillarse en la porción proximal de la hoja, presentando una marcada tendencia a la abscisión de esta.
001-e	Mer.	Cuando viene de germinación con AG se desarrolla en forma de yema. Induce la brotación de meristemas axilares.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
001-e	B.Apl	Cuando procede de germinación en AG desarrolla un brote de 2 cm con callo abundante en la base.
001-F1	Mer.	El meristemo no se desarrolla en la mayoría de los casos. Se genera una callosidad en la base del meristemo que tiende a necrosarse. En el 50% de los casos hay aparición de raíces.
001-F2	Mer.	El meristemo no se desarrolla. Hay formación de callo en la base del explante el cual tiende a necrosarse. El 30% de los casos presentan emergencia de raíces muy largas pero con el geotropismo alterado.
001-F3	Mer.	El meristemo no se desarrolla. Hay formación de callo en la base del explante, este callo es de color blanco cristalino con células pequeñas alternando con callo necrótico. La producción de raíces se presenta en el 90% de los casos pero el geotropismo está alterado.
001-F	Mer.	El meristemo no se desarrolla. Hay formación de un callo pequeño en la base; en algunos casos este es necrótico y en otros es claro cristalino. En el 75% de los casos se presentan primordios radiculares y solo el 25% presentan geotropismo alterado.
001-h	Mer.	Los meristemas en este medio se desarrollan en brotes que se mantienen con morfología de yemas sin abrir de 2 cm de longitud. En la base del explante se desarrolla una concrecencia no callosa.
001-h	Mer.	Desarrolla sin expandir las hojas, se genera un crecimiento duro en la base.
001-I1	Mer.	Desarrollo con expansión foliar y de las yemas axilares. Escasa formación de callo en la base. El brote es verde claro.
001-I2	Mer.	El desarrollo del brote es menor que en I1 y no hay crecimiento de las yemas axilares. El color del brote es menos intenso que en I1, pero la apariencia del brote es más compacta.

CLAVE	EXPLANTE	R E S U L T A D O
001- I3	Mer.	Los meristemos desarrollan poco en longitud en comparación con las dos pruebas anteriores (I1,I2). El brote tiende a ser más ensanchado y hay desarrollo abundante de callo en la base del explante. Hay tendencia a la emisión de raíces. El desarrollo del brote es proporcional al tamaño del meristemo sembrado.
001- I4	Mer.	Desarrollo reducido en longitud con notorio ensanchamiento del tallo. Tendencia a la brotación axilar. En algunos casos solo hay producción de callo en la base del explante, sin que el meristemo se desarrolle.
001- J1	Mer.	Poco desarrollo en longitud, no hay expansión foliar ni producción de callo en la base. El desarrollo de callo es escaso.
001- J2	Mer.	El desarrollo y vigor del brote es menor que en J1. Se forma una concrecencia mayor en la base del brote y las yemas axilares tienden a desarrollarse más que en J1.
001- J3	Mer.	Hay una notoria elongación del brote sin expansión foliar. La concrecencia en la base del brote es pequeña. No hay ensanchamiento del tallo.
001- J4	Mer.	Notoria elongación del meristemo acompañada de engrosamiento del tallo. El disparo de las yemas axilares es acelerado. No hay desarrollo de tejido en la base del explante.

CUADRO N°3. RESUMEN DE RESULTADOS RELEVANTES.

1. La sacarosa resultó ser la fuente de carbono mas adecuada para la variedad Negro Jamapa.
2. El sulfato de adenina no tiene ningún efecto sinérgico sobre la actividad de las citocininas.
3. El extracto cocido de semillas de frijol tiene efectos positivos sobre el desarrollo de los explantes.
4. Los explantes provenientes de plantas germinadas en luz se desarrollaron mejor que los procedentes de plantas germinadas en oscuridad.
5. La 6-BA genera el desarrollo de los explantes en la variedad Negro Jamapa, mientras que la cinetina ocasiona la defoliación y clorosis de estos.
6. El ácido indol-3-acético y el ácido naftalenacético juntos generan un enraizamiento acelerado de los brotes y las plantas que se generan en este medio se adaptan con facilidad a condiciones de cultivo en suelo.
7. Las auxinas generan una abundante producción de callo en los meristemas cultivados "in vitro".
8. La germinación de semillas en medios adicionados con 6-BA y 2,4-D generan plántulas de las cuales se obtienen explantes que producen callo abundante y friable.
9. Los callos provenientes de meristemo producen células en suspensión que duran más tiempo bajo estas condiciones de cultivo sin necrosarse.
10. La 6-BA y el ANA combinados generan un brote a partir de meristemo, que soporta muy bien la transferencia a medios en los cuales hay una combinación de AIA y ANA y en los , que se genera un buen desarrollo y enraizamiento del brote.
Las plantas que se obtienen en este último medio soportan muy bien la transferencia a suelo, florecen y fructifican generando una progenie de semilla que es muy vigorosa.
11. La 6-BA en altas concentraciones (20 mg/l) genera la proliferación de brotes múltiples "in situ" en las axilas cotiledonarias. Estos brotes tienden a caerse y no se desarrollan.

IX. DISCUSION.

Este trabajo retomó varias de las estrategias seguidas por diversos investigadores para regenerar plantas de frijol "in vitro", a partir de diversos explantes.

El aporte más valioso de este trabajo es que establece la técnica de regeneración a través de brotes apicales y meristemas e incorpora ambos métodos en un esquema de multiplicación y producción de semillas certificadas; abarcando desde el proceso de eliminación de patógenos en el laboratorio, hasta la producción de semilla certificada en campo y demuestra que la incorporación de biotecnologías a la actividad agrícola y que en combinación con otro tipo de tecnologías puede generar un incremento en la productividad del campo.

Otro logro importante de este trabajo es el de obtener la regeneración de cuatro plantas por embriogénesis somática a partir de explantes de hipocotilo cultivados en medios suplementados con extracto de semillas de frijol. Aunque la experiencia no fué reproducible, marca las posibles rutas que pudieran seguirse para conseguir el establecimiento de un protocolo de regeneración del frijol por esta vía.

Las posibles causas por las cuales la embriogénesis somática en frijol a lo largo de este experimento no se pudo repetir son las siguientes:

1.- Los explantes de los que se obtuvieron estas plantas fueron tomados de plántulas provenientes de semillas en las que la testa fué retirada después del proceso de esterilización de la semilla, lo cual ocasionó una deformación de la radícula en el momento de su emergencia, lo que a su vez provocó que el tejido dérmico y el tejido subyacente a este se rompiera, lo que pudo propiciar una discontinuidad en el gradiente natural de reguladores del crecimiento, generando una reprogramación de los tejidos, lo cual favoreció la embriogénesis directa.

2.- También existe la posibilidad de que la regeneración de estas plantas se debiera a un factor genético, ya que las semillas empleadas en esta prueba eran de un lote comercial de Pronase, lo cual implicó que la diversidad genética era amplia, dando como resultado la posibilidad de que la semilla de la que procedieron los fragmentos de hipocotilo que regeneraron plantas pudiera poseer genes que le dieran más plasticidad en este proceso, que la que poseían las demás semillas del lote. En las pruebas posteriores a esta prueba inicial se emplearon semillas provenientes de una sola planta, la cual fué seleccionada por su abundante producción, su desarrollo acelerado y vigoroso, y por su uniformidad y precocidad en la floración y fructificación

3.- En esta prueba se empleó extracto cocido de semillas, lo cual pudo provocar que alguna molécula con características de elicitor se haya liberado y en combinación con alguna o con las dos posibilidades anteriores generara la embriogénesis.

La recalcitrancia de plantas como el frijol a ser regeneradas por medio de embriogénesis somática puede ser explicada en base a la fuerte presión de selección que el hombre a ejercido sobre estos cultivos, ocasionando que se excluyan aquellos genotipos que se desvían de la estrategia "R" (reproductiva).

Esto se corrobora por las observaciones obtenidas del cultivo "in vitro" de embriones de diversas edades, las cuales indican que al menos para las condiciones ensayadas, la programación de estas estructuras queda perfectamente establecida desde etapas muy tempranas de la embriogénesis o quizás desde la ontogenia floral. De igual manera la precocidad mostrada por las plantas regeneradas en el momento de la floración y la fructificación; también parece indicar que el programa de diferenciación de plantas como el frijol queda establecido de una manera casi irreversible.

Varios investigadores que han regenerado plantas de Phaseolus vulgaris reportan un comportamiento y desarrollo normal de las plantas regeneradas una vez que son transferidas a suelo; lo cual no concuerda con lo observado con la variedad Negro Jamapa, ya que en esta se observa que la floración y la fructificación empiezan precocemente y que esta precocidad está en relación inversa al tamaño del explante cultivado "in vitro". Cuanto menor es el tamaño del explante cultivado asepticamente mayor es la precocidad y es más pequeña la talla de la planta que soporta la floración y fructificación en condiciones de cultivo en suelo, como es el caso de las plantas provenientes de la regeneración de meristemas apicales. Esto genera que la fructificación se dé de manera prolongada y continua durante un periodo largo de tiempo, y que la translocación de compuestos de las hojas a las vainas no genere la senectud y caída de las primeras sino que las hojas se mantengan verdes durante más tiempo. Esto ocasiona que las vainas no se llenen totalmente y que en varios casos solo se produzcan entre 2 y 4 semillas por vaina, a diferencia de 6 a 7 producidas en las vainas de plantas provenientes de semilla, en las cuales la floración y fructificación se dá de manera casi sincrónica en toda la planta. Este hecho aunado al del párrafo anterior parecería indicar que en el frijol existe una programación en cuanto al número de divisiones del meristemo antes de la floración y que este programa de división puede estar regulado por y con otras condiciones metabólicas internas de la planta.

X. CONCLUSION.

Con base en los resultados obtenidos se propone seguir los pasos indicados en los esquemas Nos. 6 y 7 en los que se da una secuencia del proceso de producción de semilla certificada de frijol. En este flujo de producción de semilla limpia quedaría pendiente la prueba de corroboración de ausencia de patógenos, para lo que se propone el desarrollar los sueros de diagnóstico o las sondas que permitan la detección de algunas de las enfermedades virales más importantes de este cultivo en México, con lo que quedaría completo el paquete tecnológico de certificación para Negro Jamapa.

Debido a la gran cantidad de variedades de frijol que se cultivan en nuestro país es necesario hacer extensiva la técnica de propagación clonal para obtener plantas libres de patógenos a otras de las variedades de frijol de importancia económica en México.

En base a los resultados de campo obtenidos en zonas de temporal se pone de relieve la importancia que tiene para un programa de certificación de materiales propagativos libres de patógenos, la selección de localidades climáticamente aptas y que cuenten con sistemas de riego por gravedad.

Debido a los resultados obtenidos en el cultivo de explantes provenientes de plántulas que germinaron bajo diversos tratamientos con S.R.C.V. es conveniente hacer una valoración detallada de estas plantas "in situ" y hacer un registro de su comportamiento durante todo el ciclo de vida; para detectar si en alguno de los casos hay alguna alteración sobre la floración, la embriogenia y la formación de la semilla, que pudiera ser empleada a favor de la generación de embriones somáticos.

El desarrollo de una técnica que permita la obtención de embriones somáticos directos es una de las alternativas más viables para poder transformar al frijol, pero debido a la recalcitrancia de esta planta se hace necesario el ampliar las pruebas de las condiciones de cultivo "in vitro" en los siguientes puntos:

a). Trabajar con lotes comerciales de semilla y de ser posible hacer colectas de estos materiales en el campo, seleccionando aquellas plantas que presenten características que las alejen de la estrategia "R".

b). Ampliar los tratamientos de S.R.C.V. en cuanto al tipo, combinaciones y concentraciones empleadas tanto en el proceso de germinación, para romper el programa de diferenciación establecido en la semilla; así como en las condiciones de cultivo "in vitro" para tratar de inducir la reprogramación de las células para formar embriones somáticos.

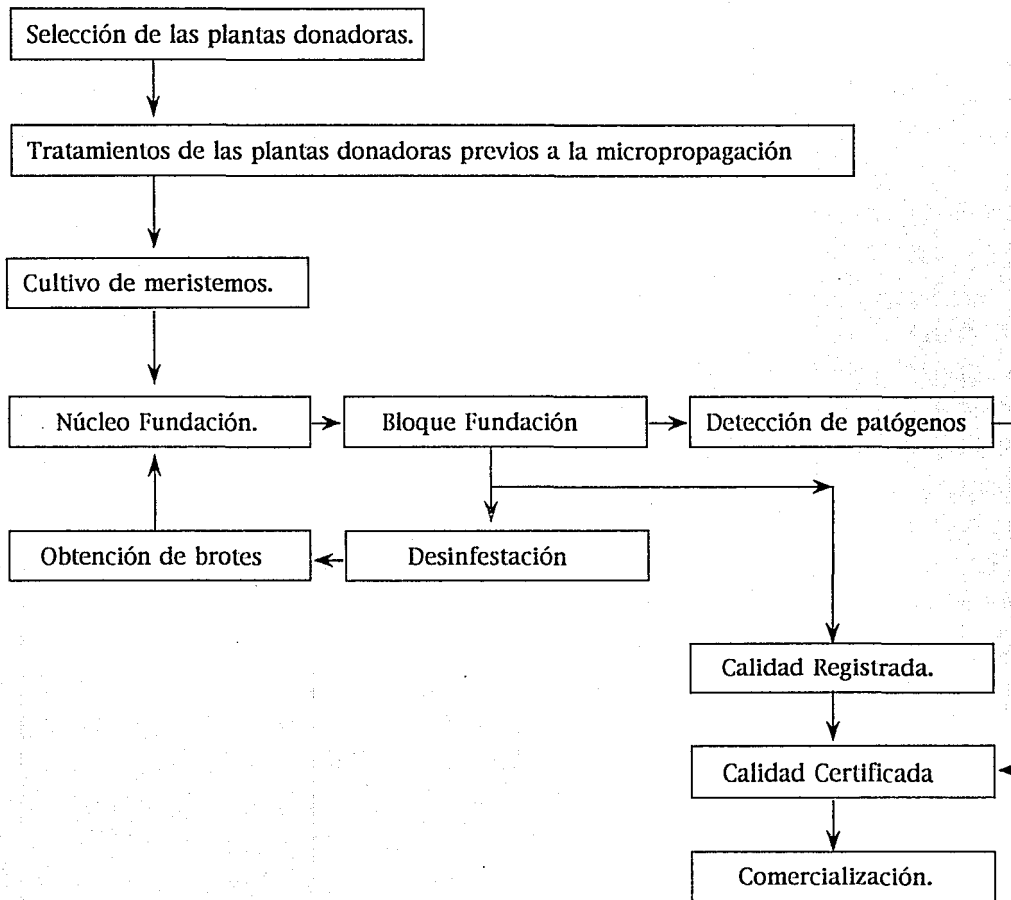
c). Sembrar explantes que procedan de plantas en las cuales se hayan practicado una serie de lesiones que propicien el rompimiento del gradiente hormonal establecido en el momento del disparo de la

germinación.

d). Ensayar el cultivo "in vitro" de diversos explantes, pero poniendo especial énfasis en aquellos tejidos directamente implicados en el proceso reproductor y abarcando estadios progresivos de desarrollo hasta los primeros momentos de formación del embrión; ya que por los resultados obtenidos en el cultivo de embriones de diversas edades; todo parece indicar que estas estructuras tienen un programa de diferenciación muy bien determinado desde las etapas iniciales de su ontogenia, lo cual hace suponer que estos programas quedan definidos desde la flor.

e). Ensayar la adición a los medios de cultivo de sustancias que se sabe favorecen la embriogénesis somática en otras especies, como son: compuestos de almacenamiento y transporte de nitrógeno ej. ácido alantoico, alantoina, aspargina, ácido glutámico, glutamina y otros aminoácidos; poliaminas ej: espermina, putresina y espermidina; y sustancias nuevas como el thidiazuron el cual ha mostrado tener un fuerte efecto citocinínico.

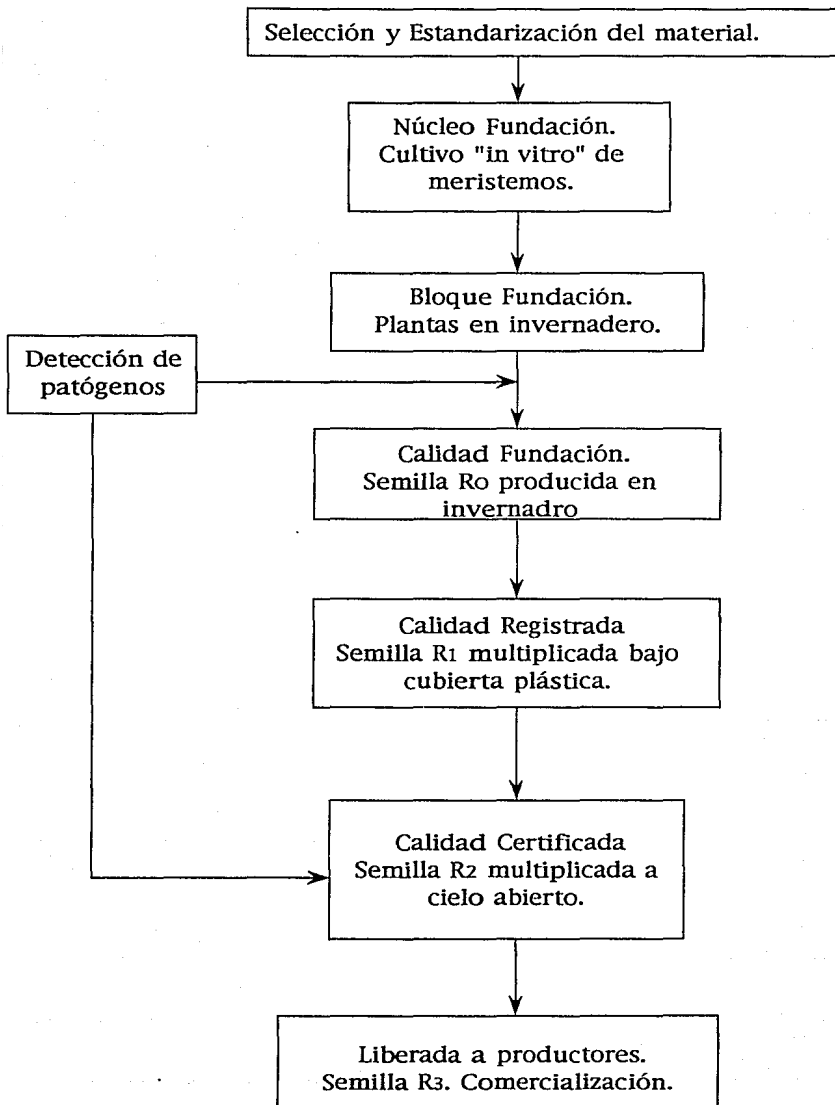
Esquema de producción de semilla libre de patógenos.



Esquema Nº 6. Esquema general de producción de semilla libre de patógenos. El Núcleo Fundación y el Bloque Fundación se manejan en el laboratorio, mientras que las calidades restantes son manejadas bajo cubiertas plásticas y a cielo abierto.

Esquema de producción de semilla de frijol libre de patógenos.

67



Esquema Nº 7. Esquema de producción de semilla de frijol libre de patógenos. En este esquema se marcan los pasos necesarios para producir de manera comercial y rentable semilla limpia de frijol.



Figura N° 1. Desarrollo del brote apical en medios complementados con extracto de semillas. A. Tratamiento 008-1, B. Tratamiento 008-2 y C. tratamiento 008-3. El desarrollo del brote apical en esta serie de pruebas no resistió la transferencia a suelo, en la mayoría de los casos el brote se empezó a necrosar a la quinta semana de cultivo "in vitro".

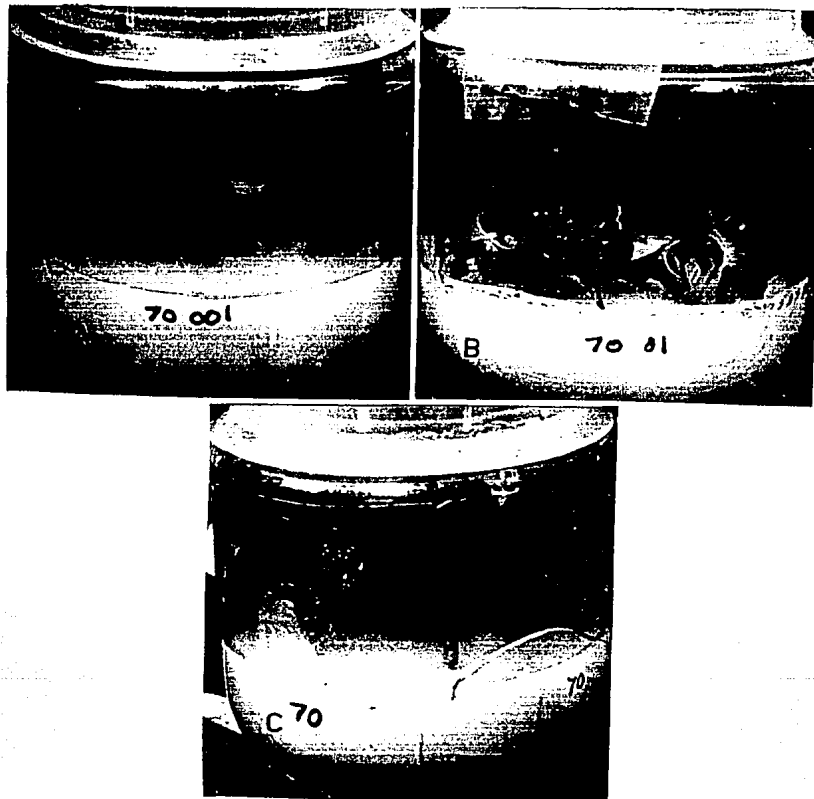


Figura N° 2. Desarrollo del brote apical en medios complementados con extracto de semilla. A: tratamiento 70 001, B: tratamiento 70 01 y C: tratamiento 70. Este último tratamiento fue uno de los que desarrollaron brotes capaces de adaptarse a condiciones de cultivo en suelo. Los dos primeros tratamientos generaron brotes que se necrosaron a la sexta semana de cultivo "in vitro".

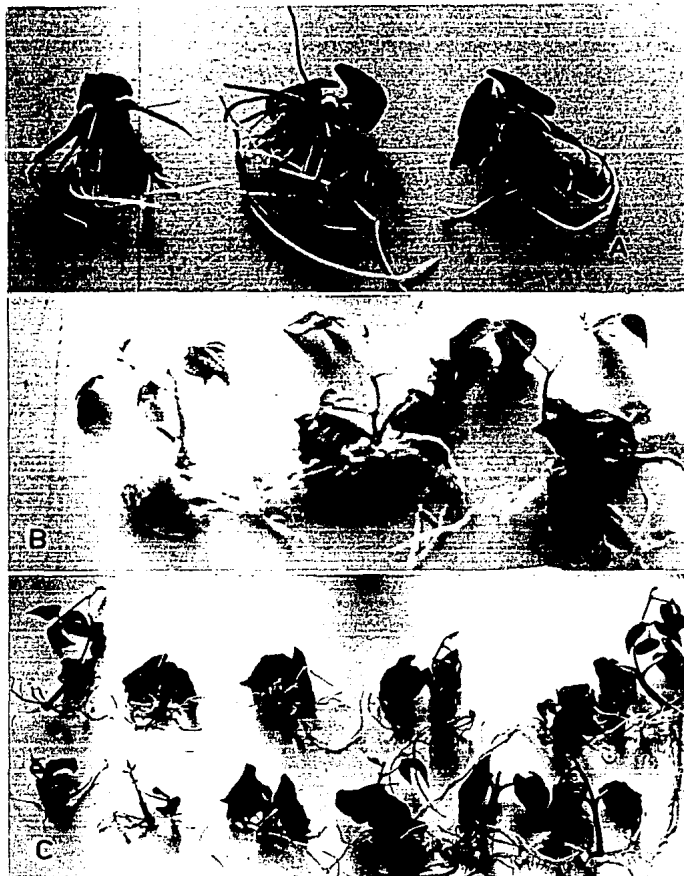


Figura N° 3. Desarrollo del brote apical en el medio de cultivo MS/B5 sin extracto de semilla. A: tratamiento 001-a, B: tratamiento 001-b, C: tratamiento 005-1. Los tratamientos 001-b y 005-1 generaron plantas que se adaptaron muy bien a condiciones de cultivo en suelo, siendo el porcentaje de prendimiento del 97%. De este porcentaje todas las plantas sobrevivieron en la fase de cultivo en invernadero.

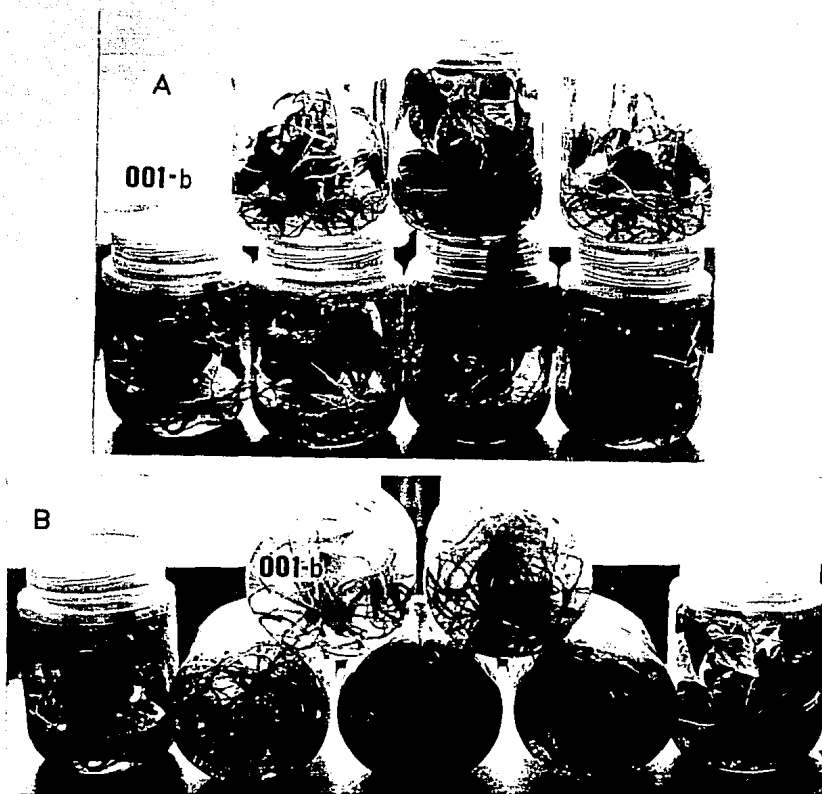


Figura Nº 4. Desarrollo del brote Apical a los 23 días de haberse sembrado el explante. A: Vista de la planta completa antes de ser transferida a suelo. B: Vista del sistema radicular generado "in vitro".

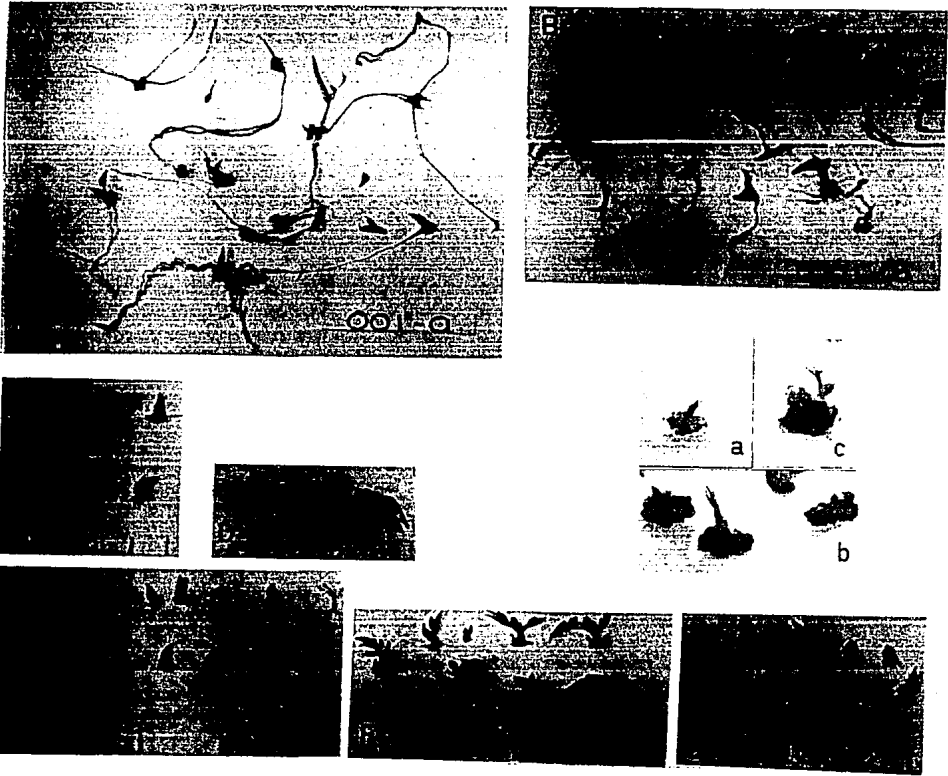


Figura Nº 5. Aspecto del desarrollo de los meristemos a las cinco semanas de haberse cultivado en condiciones asépticas. A: Meristemos cultivados en el tratamiento 001-a, B: Meristemos cultivados en el tratamiento 001-b, C: meristemos cultivados en el tratamiento 005-1, D: meristemos creciendo en el tratamiento 005-2, E: meristemos desarrollados bajo el tratamiento 001 (testigo), F: meristemos provenientes del tratamiento 001-1, G: meristemos del tratamiento 001-2, a: meristemos del tratamiento 70, b: tratamiento 71 y c: tratamiento 72. Todos los meristemos de los tratamientos anteriores fueron transferidos al medio 001-b para generar el desarrollo y enraizamiento del brote "in vitro".



Figura N° 6. Comparación del desarrollo de meristemas cultivados en diversos tratamientos. A.a. Tratamiento 001 (testigo), A.b. tratamiento 001-a, A.c: tratamiento 001-b (en este medio se obtiene el mayor crecimiento del meristemo); A.d: tratamiento 001-c. B: tratamiento 001-d, se puede observar como el meristemo desarrolla callo abundante en la base y a partir de este se producen las raíces. En este tratamiento no se desarrolla el brote.

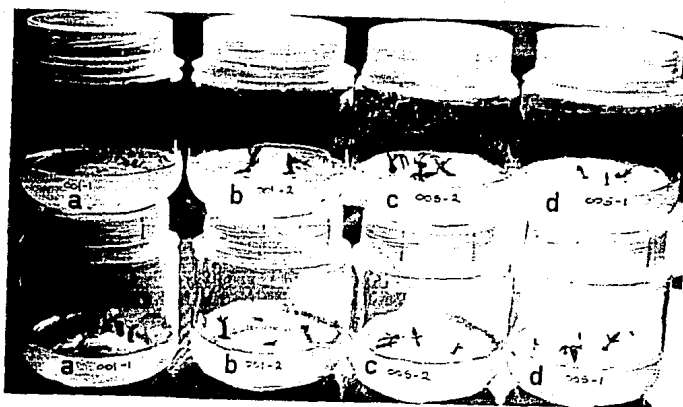


Figura N° 7. Comparación del desarrollo de meristemas en diversos tratamientos. a: tratamiento 001-1, b: tratamiento 001-2, c: tratamiento 005-2 y d: tratamiento 005-1. El tratamiento 005-2 aparte de propiciar el desarrollo del meristemo en brote también genera expansión de las hojas. Entre las diez y doce semanas de crecimiento de los meristemas en condiciones asépticas fueron transferidos al medio 001-b para continuar con su desarrollo y enraizamiento "in vitro".



Figura Nº 8. Secuencia de desarrollo de las plantas generadas a partir de brotes apicales en las fases de adaptación a suelo y desarrollo en invernadero. A: plantas generadas "in vitro" en el momento de ser transferidas a un sustrato inerte para iniciar la fase de adaptación a suelo. B: Después de permanecer dos semanas en la cámara conviron y de haberse incrementado tanto el número de nudos como la longitud de los entrenudos y la expansión foliar, las plantas fueron transferidas al invernadero.



Figura N° 9. Secuencia de desarrollo de las plantas generadas a partir de brotes apicales en la fase de invernadero. A: una vez transferidas las plantas al invernadero son adaptadas gradualmente a condiciones de intensidad de luz mayores y los riegos con sales del medio MS van siendo más diluidos. B: Plantas ya completamente adaptadas al ambiente de invernadero y transferidas a sus macetas definitivas.



Figura N° 10. Secuencia de desarrollo de las plantas regeneradas a partir de brotes apicales. A: plantas después de tres semanas de haber sido transferidas al invernadero. B: plantas de seis semanas de cultivo en invernadero.

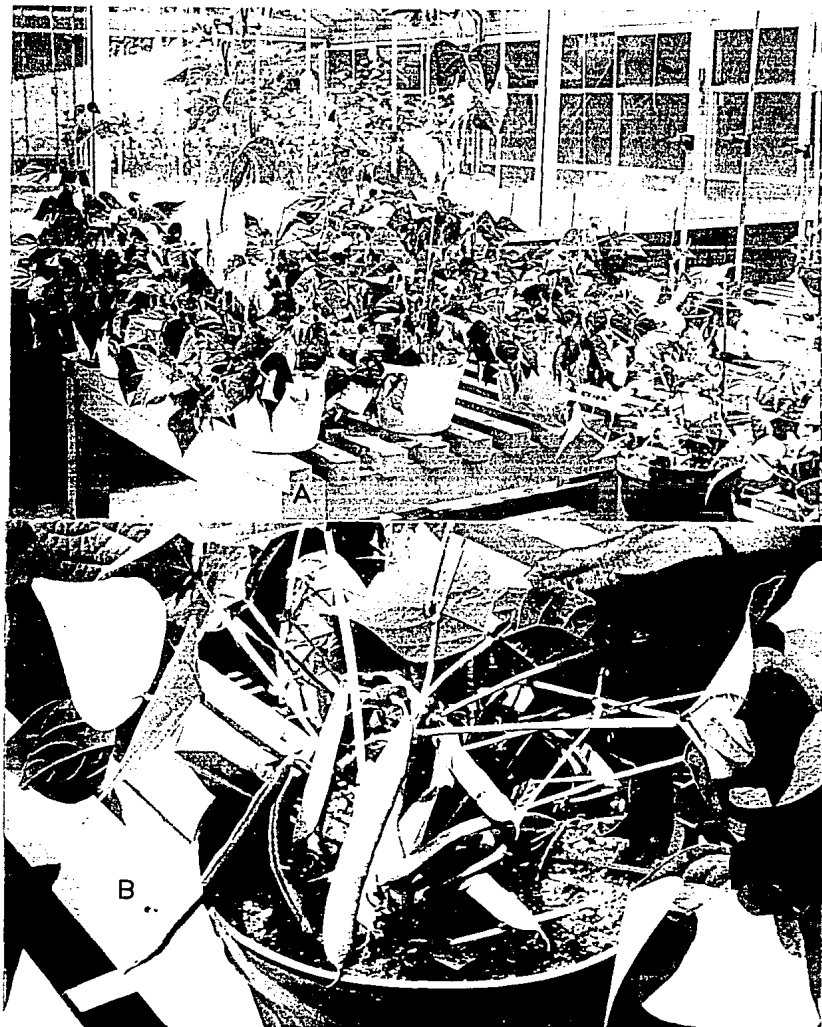


Figura Nº 11. Secuencia de desarrollo de las plantas generadas a partir de brotes apicales. A: a la novena semana de haber sido transferidas al invernadero las plantas empezaron a trasladar nutrientes de las hojas hacia las vainas. B: La fructificación se llevó a cabo principalmente en la parte baja de la planta siendo muy abundante, uniforme y sincrónica.

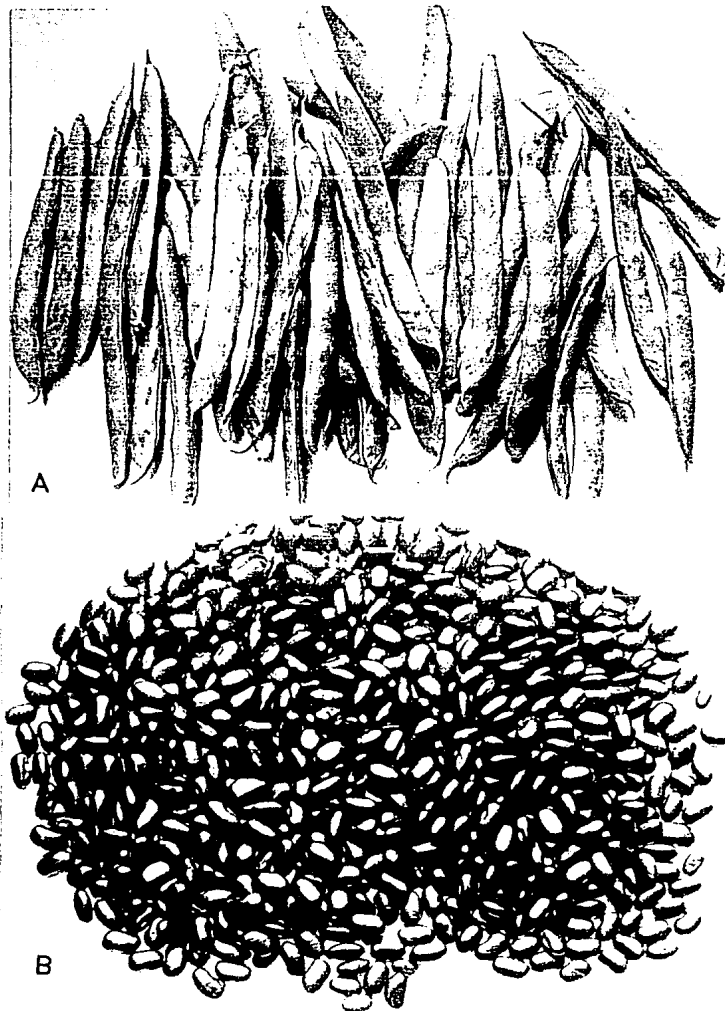


Figura N° 12. Secuencia de desarrollo de las plantas producidas a partir de brotes apicales. A: uniformidad, abundancia y sincronía en la fructificación. B: Uniformidad en el tamaño y limpieza de la semilla.

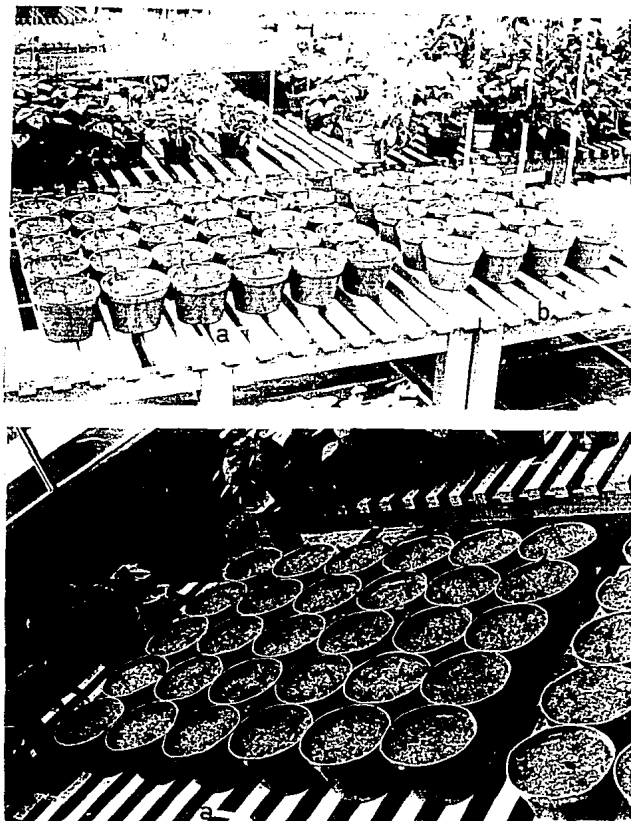


Figura Nº 13. La semilla producida a partir de la plantas regeneradas de brotes apicales fue sembrada en el invernadero con el fin de evaluar su rendimiento, comparándola con semilla comercial; y para producir la segunda generación de semilla (R1) libre de enfermedades. En la figura se aprecia el vigor y la uniformidad en la germinación de la semilla libre de enfermedades, de hongos y de bacterias sistémicos (lote a), comparado contra el lote de semilla comercial (lote b).



R1



C

Figura N° 14. El vigor de la semilla (R1) fue notorio, ya que el porcentaje de germinación tanto en campo como en invernadero fue del 100% , mientras que su contraparte comercial tuvo un porcentaje de germinación del 75%.

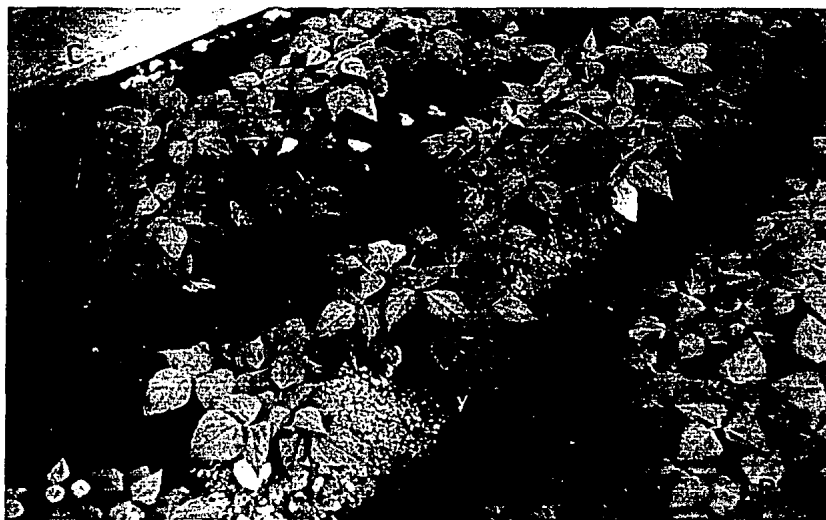


Figura N°15. Las semillas (R1) tuvieron un porcentaje de germinación del 100% en campo y el vigor mostrado por estas plantas se manifestó marcadamente en las tres primeras semanas, ya que estas plantas tenían una talla mucho más grande que su contraparte de semilla comercial; en el momento de la floración y la fructificación las plantas provenientes de semillas (R1) aventajaron por dos semanas a las semillas comerciales y el llenado de vainas y maduración de semillas fue 30 días más precoz en las plantas (R1).



R1

C

Figura N° 16. la semilla (R1) producida en invernadero a partir de plantas regeneradas de brotes apicales fue evaluada en campo comparándola contra semilla comercial producida por PRONASE y semilla limpia producida en invernadero. Los rendimientos obtenidos por la semilla proveniente de plantas regeneradas fue muy superior a la de semilla comercial y casi el doble que la proveniente de semilla limpia producida en invernadero.



Figura N° 17. Las plantas regeneradas a partir de meristemas mostraron una precocidad muy marcada, ya que a la semana de haber sido transferidas a suelo empezaban a florecer y la fructificación se realizaba aun cuando la planta era muy pequeña.

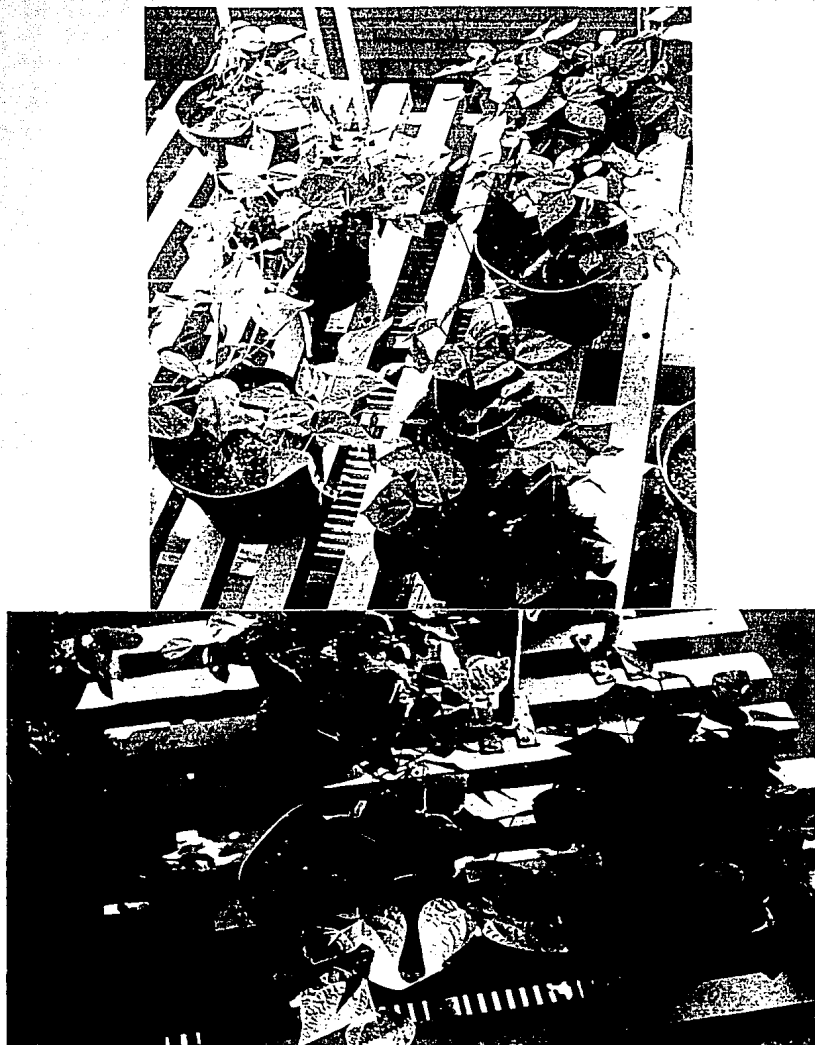


Figura Nº 18. La fructificación de las plantas regeneradas a partir de meristemas se mantuvo por bastante tiempo, se llevó a cabo en la parte baja de la planta, no fue sincrónica y las hojas no eran caducas, sino que se mantuvieron durante toda la etapa de floración y fructificación. El llenado de las vainas en estas plantas no fué tan abundante como el llenado en la plantas regeneradas provenientes de yemas apicales. El promedio de semilla por vaina en las plantas provenientes de meristemas fue de cuatro semillas por vaina.

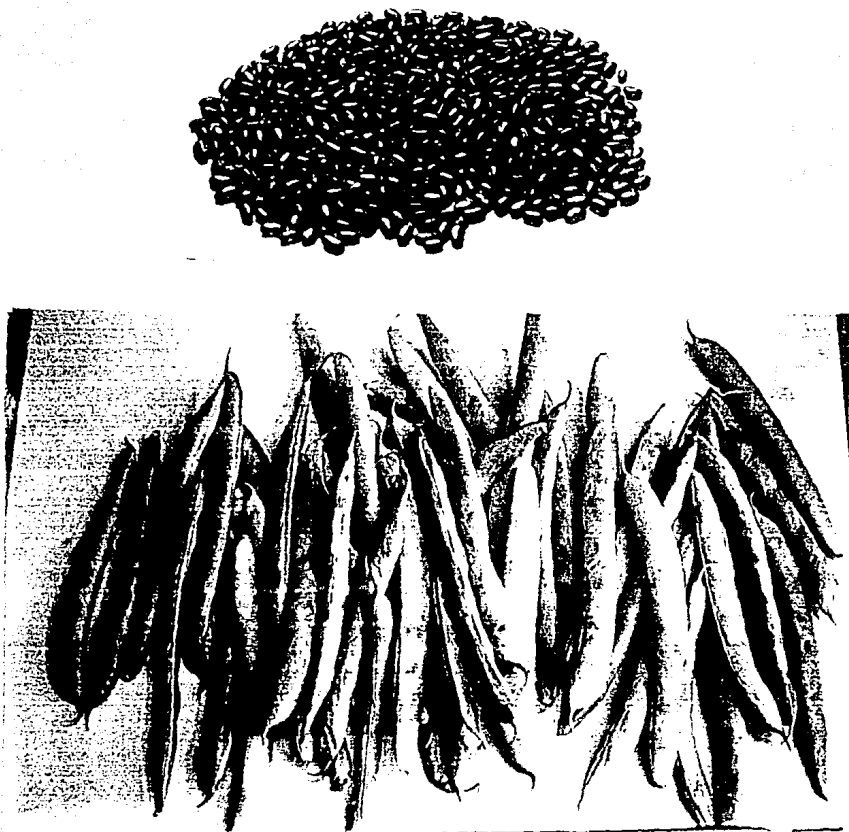


Figura N° 19. La calidad, uniformidad y limpieza de la semilla producida por las plantas regeneradas a partir de brotes apicales fue muy notoria tanto en las pruebas de invernadero como de campo. Las vainas de estas plantas se llenaron de manera muy uniforme y con un promedio de seis semillas por vaina.



Figura N° 20. Las pruebas realizadas con semillas (R1) en regiones temporales no prosperaron bien. En el municipio de Cortazar Gto., una neblina baja de cuatro días ocasionó que el cultivo se enfermara y se perdiera en su totalidad. De aquí que es recomendable que para un programa de producción de semilla limpia certificada se empleen terrenos con condiciones de riego por gravedad y ubicados en zonas climáticas aptas para este propósito.



Figura Nº 22. En la zona de Miacatlán Mor, el cultivo de semilla (R1) tuvo rendimientos muy altos, sobre todo por las condiciones de riego y por la climatología del lugar. A esto se puede aunar el hecho de que el cultivo fue realizado en la época del año en que las plagas y enfermedades de este cultivo no prosperan.



Figura Nº 23. Para la callogénesis se emplearon explantes de hoja y meristemos. Los callos provenientes de hoja se necrosaron más rápidamente que los provenientes de meristemo una vez que fueron transferidos a medios líquidos.

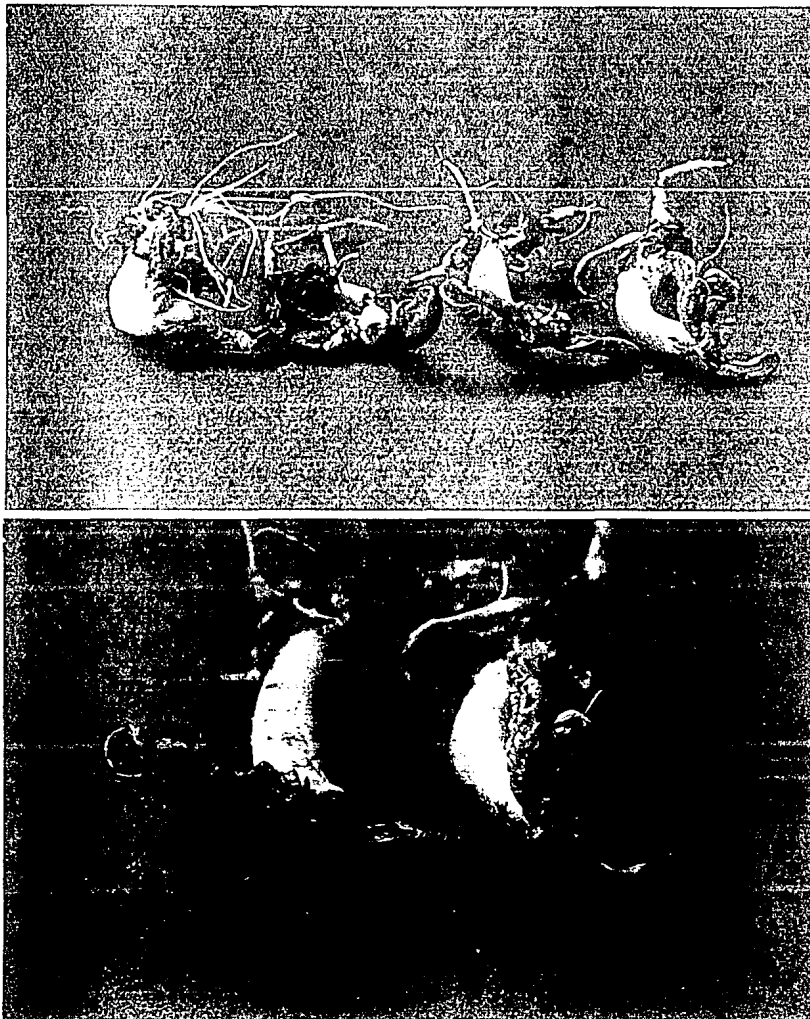


Figura N° 24. Bajo concentraciones altas de 6-BA (20 mg/l) los nudos cotiledonarios produjeron brotación múltiple a partir de las axilas del cotiledón, pero estas yemas fueron caducas y no resistieron la transferencia a medios de enraizamiento.

XI. BIBLIOGRAFIA.

Allavena, A. and Sharp, W.R. 1981. Adventitious shoots and plantlets development of Phaseolus vulgaris apical buds grown "in vitro". Proceedings XXV Meeting of the Italian Society for Agricultural Genetics.

Allavena, A. and Rossetti, L. 1986. Micropropagation of bean (Phaseolus vulgaris L.); effect of genetic, epigenetic and environmental factors. Scientia Horticulturae, 30: 37-46.

Ammirato, P.V., (1983). Embryogenesis In Handbook of Plant Cell Culture. Vol I. ed. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, and Y. Yamada. New York: Macmillan.

Bevan, M. and Northcote, D.H. 1979. The loss of morphogenetic potential and induction of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultures of Phaseolus vulgaris. J. Cell Sci. 39:339-353.

Bolkan, H.A., A.R. de Silva y F.P. Cupertino. 1976. Fungi associated with soybean and their control in Central Brazil. Plant Dis. Reprtr. 60:545-548.

CIAT. 1974. Sistemas de Producción de Frijol. En, Informe Anual. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia.

CIAT. 1975. Sistemas de Producción de Frijol. En, Informe Anual. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia.

CIAT. 1973-1979. Programa de Frijol, Informes Anuales. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

Copeland, L.O., M.W. Adams y D.C. Bell. 1975. An improved seed programme for maintaining disease-free seed of field beans (Phaseolus vulgaris). Seed Sci. Tech. 3:719-724.

Crocorno, O.J., Sharp, W.R. and Peters, J.E. 1976. Plantlet morphogenesis and the control of callus growth and root induction of Phaseolus vulgaris with the addition of a bean seed extract. Z. Pflanzenphysiol. 78:456-460.

Crocorno, O.J., Peters, J.E. and Sharp, W.R. 1976. Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured Phaseolus vulgaris leaf explants.

Davies, P.J. 1987. Plant hormones and their role in plant growth and development. Martinus Nijhoff Publishers. Distrib. Kluwer Academic Publishers. Accord Station, Hingham, M.A..

Dodds, J.H., and L.W. Roberts, (1985). Special Topics: Virus Eradication In Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press.

Dickinson, M.H. y M.A. Boettger. 1976. Factors associated with resistance to mechanical damage in snap beans (Phaseolus vulgaris L.). Amer. Soc. Hort. Sci. 101:541-544.

Ekpo, E.J.A. y A.W. Saettler. 1974. Distribution pattern of bean common mosaic virus in developing bean seed. Phytopathology 64:269-270.

Ellis, M.A. y J.B. Sinclair. 1976. Effect of benomyl field sprays on intrnally borne fungi, germination and emergence of late-harvested soybean seeds. Phytopathology 66:680-682.

Ellis, M.A., G.E. Gálvez y J.B. Sinclair. 1976. Control of dry bean seed infection by Colletotrichum lindemuthianum with foliar fungicides. En Fungicide-Nematode Test, Results of 1976, 32:70

Ellis, M.A., G.E. Gálvez y J.B. Sinclair. 1976. Effect of pod contact eith soil on fungal infection of dry bean seeds. Plant Dis. Reprtr. 60:974-976

Ellis, M.A., G.E. Gálvez y J.B. Sinclair. 1976. Effect of foliar applications of systemic fungicides and late harvest on seed quality of dry beans (Phaseolus vulgaris). Plant Dis. Reprtr. 60:1073-1076.

Ellis, M.A., G.E. Gálvez y J.B. Sinclair. 1976. Efecto del tratamiento de semillas de frijol (Phaseolus vulgaris) de buena y mala calidad sobre la germinación en condiciones de campo. Turrialba 27:37-39.

Ellis, M.A., G.E. Gálvez y J.B. Sinclair. 1976. Efecto de tres fungicidas sobre la germinación de semilla infectada de frijol (Phaseolus vulgaris). Turrialba 26:399-402.

Ellis, M.A., G.E. Gálvez y J.B. Sinclair. 1976. Hongos internamente portados por la semilla y calidad de la semilla de frijol (Phaseolus vulgaris L.) cosechado en fincas de pequeños agricultores en cuatro departamentos de Colombia. Not. Fitopat. 5:79-82.

Evans, D.A. 1983. In Handbook of Plant Cell Culture, Vol I (Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y., eds.), pp. 291-321, Macmillan, New Yoek.

Flick, C.E. 1983 In Handbook of Plant Cell Culture, Vol I. (Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y., eds.), pp. 393-441, Macmillan, New York.

Flores, D.F. 1992. Manual de micropropagación. SEP. SEIT. DGETA. México D.F.

Freirer, R.P., Mignon, G., and Litvay, J.D. (1984). Arginine descarboxilase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. Science 223:1433-1435.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. J. Exp. Res. 50: 151-158.

Grimes, H.D. and Hodges, T.K. 1990. The inorganic $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica Rice. J. Plant Physiol. 136: 362-367.

Giles, K.L., and Morgan, W.M. 1987. trends Biotechnol. 5, 35-39.

Guthrie, J.W. 1975. The epidemiology and control of halo-blight in Idaho. Idaho Agr. Exp. Sta. Bull. N°550, 11 p.

Hartman, H.T., and D.E. Kester. 1975). Propagación de plantas principios y prácticas. CECSA, México.

Heinz, D.J., Krishnamurathi, M., Nickell, L.G., and Maretzki, A. 1977. In Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Reinert, J., and Bajaj, Y.P.S., eds.), pp 3-17, Springer-Verlag, New York.

Hollings, M. (1965). Disease control through virus free stock. Ann. Rev. Patology. 3: 367-396.

Hollings, M., Stone, O.M. and Dale, W.T. 1972. Plant Pathol. (London). 21, 46-47.

Hu, C.Y., and Wang, P.K. (1983). Meristem, Shoot tip, and bud culture. In Handbook of plant cell and tissue culture. Vol I, Techniques for propagation and breeding. ed. D.A. Evans, W.R.

Jeffer, R.A., and Northcote, D.H. 1967. The influence of indol-3-acetic acid and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture. J. Cell. Sci. 2:77-88

Kamal, A., Saxena, M.K. and Saxena, P.K. 1991. Regeneration in Phaseolus vulgaris L. Planta 184: 148-150.

Kartha, K.K., Pahl, K., Leung, N.L., and Morginski, L.A. 1981. Plant regeneration from meristem of grain legumes: Soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. Can. J. Bot. 59: 1671-1679.

Kasha, K.J., and Reinbergs, E. 1980. In Plant Genome (Davies, D.R., and Hopwood, D.A., eds.), pp 215-230, The Johns Innes Charity, Norwich, England.

King, P.J. (1980). Cell proliferation and growth in suspension cultures. Int. Rev. Cytol. Supplement 11A, 25-54.

King, P.J., and Street, H.E. (1977). Growth patterns in cell cultures. In Plant tissue and cell culture, ed. H.E. Street, pp. 307-387. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Kinnersley, A.M. and Henderson, W.E. 1988. Alternative carbohydrates promote differentiation of plant cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 15:3-16.

Kolenbach, H.E. (1978). Comparative somatic embryogenesis. In Frontiers of plant tissue culture, ed. T.A. Thorpe. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture.

Kueneman, E.A. 1976. Meristem culture in Phaseolus vulgaris. *Bean Improve. Coop.* 19:53-55.

Larkin, D.J., and Scowcroft, W.R. 1981. *Theor, Appl. Genet.* 60, 197-214.

Leopold, A.C. 1980. Hormonal regulating systems in plants. In *Recent Development in Plant Science*, pp 33-41, Sen S.P. ed. Today and Tomorrow Publishers, New Delhi.

Lopez, L.C. y Christensen, C.M. 1962. Efectos del ataque de hongos en el frijol almacenado. *Agr. Téc. en México* 2:33-37.

Lopez, L.C. y Crispin, A. 1971. Resistencia varietal del grano de frijol almacenado al ataque por hongos. *Agr. Téc. en México* 3:67-69.

Murashigue, T. and Skoog, F. 1962A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

Murashigue, T. 1974. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.

Murashigue, T. 1978. In *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe, T.A., ed.), pp 15-26, University of Calgary Press, Calgary, Canada.

Mariotti, D., Fontana, G.S. and Santini, L. 1989. Genetic Transformation of grain legumes: Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus L. *J. Genet. and Breed.* 43:77-82.

McClellan, P. and Grafton, K.F. 1989. Regeneration of dry bean (Phaseolus vulgaris L.) via organogenesis. *Plant Science.* 60:117-122.

Molina M., J., Estrada G., M. Livera M., y V. A. González H. (eds.). 1990. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México. SOMEFI. Chapingo, México.

Over de Linden, A.J., and Elliot, R.F. (1971). Virus Infection in Ipomea batatas and a method for its elimination. *N.Z. Journal Agr. Res.* 14:720-724.

Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., and Zbell, B. (1977). Aspects of

~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~

~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~

Miller, A. and Kevane, K.K. 1982. The effects of abiotic and biotic factors on various parasitic species and collection of them. *Phytopath.* 72:104-108.

Schweitzer, L.S. 1972. Reduction in seedling vigor and changes in metabolism during germination related to mechanical damage of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed. Ph.D. Thesis, Michigan State Univ., 88 p.

Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Gallo, L.S., and Maratta, R.H. (1981). The Physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Plant Biol.* 4: 268-310.

Sharp, P.V., Ammirato, and V. Yamada, pp 111-121. *Dev. Vicks* Macmillan.

Schuster, M.L. y D.P. Coyne. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.* 12:301-331.

Shepard, J. 1982. *Sci. Am.* 246, 164-166.

Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Wym. Ann. Exp. Biol.* 11:112-130.

Street, H.E. (1971). *Plant Tissue and Cell Culture: The Biology of California Press, Berkeley and Los Angeles.*

Street, H.E., and Wilson, L.H. (1976). The anatomy of embryogenesis in culture. In *Tissue Culture and Plant Biotechnology* 1974. ed. H.E. Street. *Indiana University Press.*

Taylor, J.D. y Dudley, G.H. (1971). *Plant Tissue Culture: The Biology of Plant Tissue Culture*. *Indiana University Press.* 35:223-232

Thomas, B., and Drey, H. (1971). *Plant Tissue Culture: The Biology of Plant Tissue Culture*. London: Taylor.

~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~

~~_____~~

- organization: Organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In Plant Tissue and Cell Culture, 2d ed., ed. H.E. Street, pp 389-427, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ross, M.K., Thorpe, T.A., and Costerton, J.W. (1973). Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus culture. *Am. J. Bot.* 60:788-795.
- Rubluo, A. and Kartha, K.K. 1984. "In vitro" culture of shoot apical meristems of various Phaseolus species and cultivars. *J. Plant. Physiol.* 119:425-433.
- Schweitzer, L.R. 1972. Reduction in seedling vigor and changes in metabolism during germination related to mechanical abuse of bean (Phaseolus vulgaris L.) seed . PH.D. Dissert., Michigan State Univ., 88 p.
- Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Caldas, L.S., and Maraffa, S.B. (1980). The Physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* 2: 268-310.
- Sharp, P.V. Ammirato, and Y. Yamada, pp 177-227. New York: Macmillan.
- Schuster, M.L. y D.P. Coyne. 1974. Survival mechanisms of phytopatogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.* 12:199-221.
- Shepard, J. 1982. *Sci. Am.* 246, 154-166.
- Skoog, F., and Miller, C.O. (1975). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-130.
- Street, H.E. (1971). *Plant tissue and cell culture*. University of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Street, H.E., and Withers, L.A. (1974). The anatomy of embryogenesis in culture. In Tissue Culture and Plant Science, 1974. ed. H.E. Street. London: Academic Press.
- Taylor, J.D. y Dudley, C.L. 1977. Seed treatment for the control of halo-blight of beans (Pseudomonas phaseolica). *Ann. Appl. Biol.* 85:223-232
- Thomas, E., and Davey, M.R. (1975). *From single cells to plants*. London: Wykelham.
- Thorpe, T.A. (1978). Physiological and biochemical aspects. In Perspectives in Plant and Cell Tissue Culture. 1978, ed T.A. Thorpe, pp 49-58. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture.
- (1980). Organogenesis in vitro: Structural,

physiological, and biochemical aspects In Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Internat. rev. Cytol. SUPPL. 11A. ed I.K.Vasil, pp 71-111. New York. Academic Press.

Tonin, G.S., Derbyshire, M.T.V.C., Sharp, W.R. and Crocomo, O.J. 1982. Amino acids in the callus growth and root morphogenesis bean (Phaseolus vulgaris) leaves cultured in vitro. Tonzig, S. 1968. Botanica, Vol. 2 (Ed. Ambrosiana). Milano.

Tran Than Van, K. (1980). Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. In Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Internat. Rev. Cytol. Suppl, 11A. New York: Academic Press.

Tonin, G.S., Derbyshire, M.T.V.C., Sharp, W.R. and Crocomo, O.J. (1982). Amino acids in the callus growth and root morphogenesis bean (Phaseolus vulgaris) leaves cultured in vitro. Tonzig, S. 1968. Botanica, Vol. 2 (Ed. Ambrosiana). Milano.

Veliky, A., and Martin, S.M. 1970. A fermenter for plant cell suspension cultures. Can. J. of Microbiol. 16:223-226.

Wetzel, C.T., de Almeida, L.D.A., Toledo, F.F., Abraho, J.T.M., Miyasaka, S. y Navarro, O.P. 1972. Produçao de sementes de feijao. En, Anais do I Simpósio Brasileiro de Feijao. Viçosa, Brasil, Universidade federal de Viçosa, 2: 417-462.

Yamada, Y., and Hashimoto, T. 1982. Plant Cell Rep. 1, 101-103.

Yamada, Y., and Fujita, Y. 1983. In Handbook of Plant Cell Culture, Vol. I (Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y., eds.), pp.717-728, Macmillan New York.

York, D.W., M.H.Dickson y G.S. Abawi. 1977. Inheritance of resistance to seed decay and pre-emergence damping-off in snap beans by Phytium ultimum. Plant Dis. Reprtr. 61:285-289.

Zenk, M.H. 1978. In Frontiers of Plant Tissue Culture (Thorpe, T.A., ed.), pp. 1-13, University of Calgary Press, Calgary, Canada.

Zaumeyer, W.J. y H.R. Thomas. 1957. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S.D.A. Agr. Tech. Bull N°868, 255p.

AGRADECIMIENTOS.

Se agradece a la DGAPA por el financiamiento al proyecto N° IN300492 con el título "Regeneración de plantas de frijol Phaseolus vulgaris por cultivo in vitro de meristemos" con el cual fué posible la realización del presente trabajo.

De igual manera se agradece el apoyo y guía a los Drs. Miguel Lara Flores, Federico Sánchez Rodríguez y Agustín López Munguía; tutor y cotutores respectivamente de este trabajo.

Un agradecimiento especial a los Drs. Mario Soberón Chávez y Jorge Vázquez Ramos por sus observaciones y correcciones en la revisión final de este trabajo.

Por último mi gratitud al Lic. Víctor Mendoza de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria por su apoyo, el cual facilitó mi permanencia en el posgrado.