

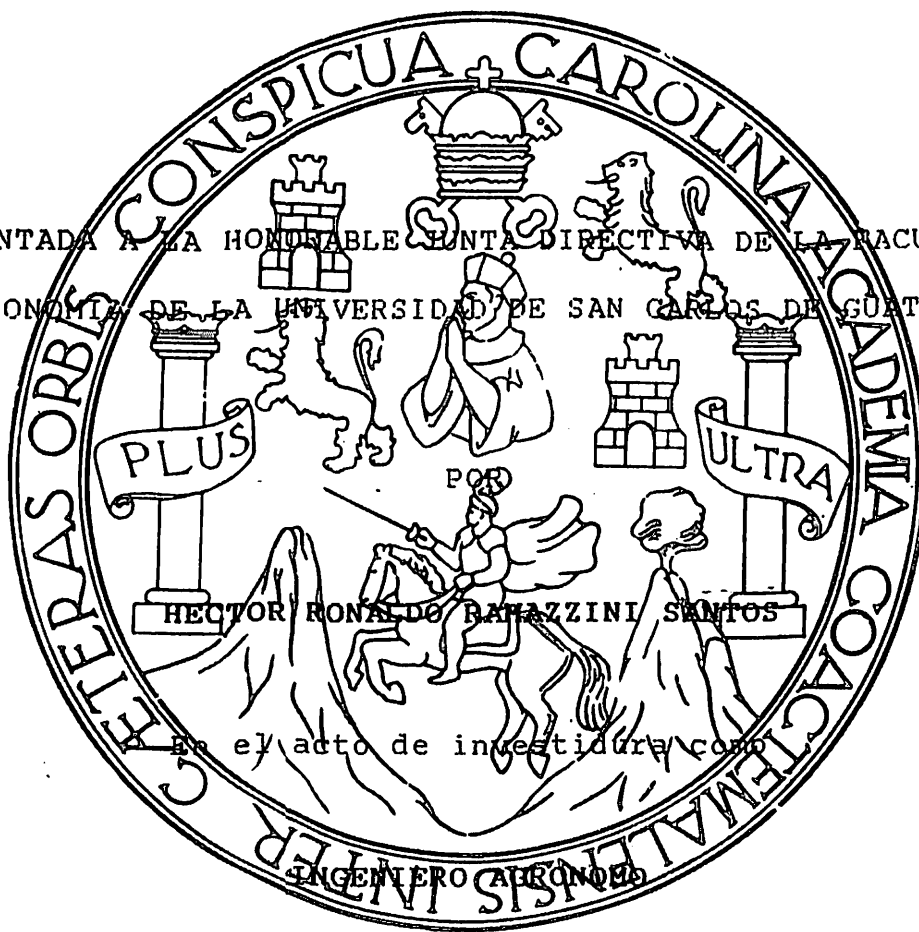
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS



RESPUESTA DEL FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris) cv.

A LA INDUCCION DE CALLO Y AL CULTIVO DE
CELULAS EN SUSPENSION

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



EN
SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO

Guatemala, Agosto de 1992

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	:	Ing. Agr. Efrain Medina Guerra
VOCAL PRIMERO	:	Ing. Agr. Mynor Estrada
VOCAL SEGUNDO	:	Ing. Agr. Waldemar Nufio
VOCAL TERCERO	:	Ing. Agr. Carlos Roberto Motta de Paz
VOCAL CUARTO	:	Br. Elias Raimundo
VOCAL QUINTO	:	P. Agr. Francisco Ibarra
SECRETARIO	:	Ing. Agr. Marco R. Estrada Muy

Guatemala, 24 Agosto de 1992

señores
Honorāble Junta Directiva
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

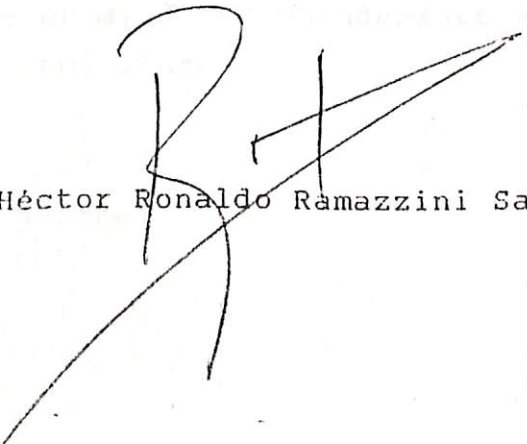
De Conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

RESPUESTA DEL FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris) CV. PARRAMOS A LA INDUCCION DE CALLO Y AL CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

Esperando contar con la aprobación del mismo.

Atentamente



Héctor Ronaldo Ramazzini Santos

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Ser omnipresente que me ha permitido
alcanzar este pequeño triunfo y que me
permita aprender a verlo en mi prójimo

A MIS PADRES

Héctor Francisco Ramazzini Quiñonez
Irma Aurora Santos Morales

A MIS HERMANAS

Geraldina Iselin
Rucklyn Amarilis

A MI SOBRINA

Iselin Larissa para que, esto le sirva como
proyección en su vida.

A MIS ABUELOS

por la ayuda recibida

A MI FAMILIA

en general

A Lesbia Lorena Pérez Reyes

A TODOS LOS DOCENTES que me ayudaron grandemente a llegar a don-
de hoy llego

A TODOS MIS AMIGOS en general

TESIS QUE DEDICO

- A: Guatemala
- A: La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, para que cada día genere más investigación en pro del desarrollo agrícola del País.
- AL: Instituto Técnico de Agricultura, Glorioso centro en donde se forjó una buena parte de mi personalidad
- A: Los centros educativos por cuyas aulas pase y recibí los conocimientos necesarios, para aplicarlos hoy en beneficio de la comunidad y personal
- A: Los Ingenieros Agrónomos Edgar Franco, Domingo Amador y José Calderón, pilares fundamentales en el desarrollo de este trabajo de investigación
- A: Mis compañeros y colegas muy especialmente a los Ingenieros:
- Jorge Mario Chiquin Marroquin
 - Ernesto Yac Juarez
 - Abelardo Pérez Melgar
 - Luis Enrique Velázquez Sagastume
 - José Calderón
 - Gustavo Adolfo Alvarez
 - Silvia Calderón
 - Luis Caniz Terraux
 - Catalino Miculax León
- A: La Subarea de Manejo y Mejoramiento de Plantas de la Facultad de Agronomía.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar constancia escrita de mi agradecimiento a todas las personas o instituciones que de una u otra manera hicieron posible mi vida estudiantil, el Ejercicio Profesional Supervisado, el trabajo de tesis y el trabajo como profesional

- Ingeniero Agrónomo Domingo Amador, profesional con quien se inició la inquietud de investigación en el tema que hoy se presenta y por su eficiente asesoría durante todo el trabajo
- Ingeniero Agrónomo Edgar Franco, destacado profesional quien en todo momento estuvo atento al desarrollo del trabajo con la finalidad que se hiciera lo más científicamente posible y por su eficiente asesoría al trabajo.
- Ingeniero Agrónomo José Calderón, profesional con quien compartí muchas horas de trabajo de laboratorio y que reconozco los aportes hechos al trabajo.
- Señor Reginaldo Soma, quien siempre fue un buen apoyo en el desarrollo de este trabajo como en las actividades docentes que desempeñe en la Facultad de Agronomía.
- Ingeniero Agrónomo Fredy Hernandez, con quien compartí muchas experiencias en la practica del Ejercicio Profesional Supervisado
- Empresa "Agropecuaria Popoyan", empresa en el cual inicie mi trabajo como profesional, especialmente al Ing. Agr. Francisco Viteri por su estrecha colaboración para la culminación de mi carrera profesional.
- Los compañeros de promoción del Instituto Técnico de Agricultura, con quienes compartí grandes momentos especialmente a: Edwin Romeo Ramirez P., Orlando Antonio Ramirez Escalante, Rutilo Trinidad Recinos Vargas.

CONTENIDO

Número de página

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION.....	3
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
4.	MARCO TEORICO	
4.1	Aspectos Generales sobre Biotecnología	6
4.2	Cultivo de Tejidos.....	6
4.3	Importancia del Cultivo de Tejidos...	7
4.4	Estado Actual del Cultivo de Tejidos.	8
4.5	Inducción de Callo	9
4.5.1	Tipos de Callos	9
4.5.2	Utilización del Callo.....	9
4.5.3	Factores que Influyen en el Crecimiento de los Callos.....	10
4.5.4	Medio de Cultivo.....	10
4.5.4.A	Sales Inorgánicas.....	11
4.5.4.B	Vitaminas.....	12
4.5.4.C	Azúcares.....	13
4.5.4.D	Compuestos Indefinidos y Aminoácidos.	13
4.5.4.E	Reguladores del crecimiento.....	14
4.5.4.F.a	Importancia de los Reguladores del Crecimiento en los Medios de Cultivo.	14
4.5.4.F.b	Uso de Algunas Auxinas en Cultivo de Tejidos.....	15
4.5.4.G	Otros Componentes del Medio de Cultivo.....	16
4.5.4.G.a	el PH.....	16
4.6	El Tejido Vegetal como Factor de Crecimiento de Callo.....	16
4.6.1	Tipo de Planta	17

4.6.2	Parte de la Planta.....	17
4.6.3	Edad de la Planta.....	17
4.6.4	Tamaño y Forma del Explante.....	17
4.7	Condiciones de Incubación.....	18
4.8	Iniciación del Cultivo.....	18
4.9	Cultivo de Callos en Frijol.....	19
4.10	Suspensión Celular.....	20
4.10.1	Definición de un Cultivo Celular.....	20
4.10.2	Características de un Cultivo de Células.....	20
4.10.3	Usos del Cultivo de Células.....	21
4.10.4	Obtención de un Cultivo de Células...	21
4.10.5	Definición de Friabilidad y su Importancia en el Cultivo de Células.....	21
4.10.6	Crecimiento de Células en Suspensión.	22
4.10.7	Morfología de las Células que crecen en Suspensión.....	23
4.10.8	Medición del Crecimiento Celular en un Cultivo.....	23
4.10.9	Aplicación del Cultivo de Células....	24
4.11	Cultivo de Células en Suspensión en Frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>).....	24
4.12	Algunos Estudios en la Organización de callos en Frijol.....	25
5	OBJETIVOS.....	27
6	HIPOTESIS.....	28
7	METODOLOGIA.....	29
7.1	Descripción del Area en Dónde se Realizó en la Investigación.....	29
7.2	Material Vegetal.....	29
7.3	Desarrollo de la Investigación.....	29
7.3.1	Evaluación de Medios de Inducción de Callo.....	30
7.3.1.A	Diseño Experimental.....	30
7.3.1.A.a	Tratamientos.....	30
7.3.1.A.b	Unidad Experimental.....	31

7.3.1.B	Variables Evaluadas.....	31
7.3.1.C	Análisis de la Información.....	32
7.3.1.D	Manejo del Experimento.....	33
7.3.1.D.a	Preparación de Medios.....	33
7.3.1.D.b	Transferencia del Medio.....	34
7.3.1.D.c	Obtención de Explantes.....	34
7.3.1.D.d	Proceso de Siembra.....	35
7.3.1.D.e	Condiciones de Incubación.....	35
7.3.2	Suspensión Celular.....	36
7.3.2.A	Diseño Experimental.....	36
7.3.2.A.a	Tratamientos.....	36
7.3.2.A.b	Unidad Experimental.....	36
7.3.2.B	Fuente de Células.....	37
7.3.2.C	Variable Respuesta y Forma de Medirla	37
7.3.2.D	Análisis de la Información.....	37
7.3.2.E	Manejo del Experimento.....	38
7.3.2.E.a	Preparación de Medios.....	38
7.3.2.E.b	Procedimiento de Siembra.....	38
7.3.2.F	Condiciones de Incubación.....	39
8	RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
8.1	Inducción de Callo.....	40
8.2	Suspensión Celular.....	49
9	CONCLUSIONES.....	56
10	RECOMENDACIONES.....	57
11	BIBLIOGRAFIA.....	59
12	APENDICES.....	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Nombre	Página
1.	Combinaciones de las auxinas 2,4-D y ANA utilizadas en el estudio de inducción de callo en explantes de frijol comun (<u>Phaseolus vulgaris</u>) var. Parramos.....	30
2.	Tipos de explante de frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>) utilizados en la induccion de callo.....	31
3.	Auxinas utilizadas en el estudio de cultivos de suspensión celular en callos de frijol común (<u>Phaseolus vulgaris</u>).....	36
4.	Respuesta de los 40 tratamientos en la fase de inducción de callo, utilizando explantes de frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>) var. Parramos.....	40
5.	Tratamientos que respondieron a la inducción de callo, medias obtenidas y medias corregidas por el ANCOVA para el peso seco del callo formado más el explante utilizado.....	42
6.	Respuesta en formación de callo por los 10 tratamientos que respondieron a la inducción de callo y prueba de Tukey al 5% para las medias de los tratamientos....	44
7.	Valores Rj calculados según la prueba de Friedman para las variables Consistencia y Presencia de Raíces.....	47

8A	Peso seco de los tratamientos en el día 2 posterior a la siembra.....	64
9A	Peso seco de los tratamientos en el día 15 posterior a la siembra.....	64
10A	Número de células de los tratamientos en el día 2 después de la transferencia.....	65
11A	Número de células de los tratamientos en el día 22 posterior a la transferencia....	65
12A	Resumen del Análisis de Covarianza efectuado entre el peso seco del explante al momento de la siembra y el peso seco del callo formado más el explante.....	66
13A	Resumen del Analisis de Varianza aplicado a la formación de callo.....	66
14A	Resumen del análisis de Covarianza aplicado a los cultivos celulares, para encontrar efecto del número inicial de células sobre el número final.....	67

INDICE DE FIGURAS

No.	Nombre	Página
1	Respuesta en incrementos periódicos de los diferentes explantes de frijol común a la aplicación de diferentes combinaciones de auxinas.....	45
2	Efecto de las auxinas sobre la multiplicación celular, en cultivos celulares in vitro de frijol común variedad Parramos	52

RESPUESTA DEL FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris)cv.
PARRAMOS A LA INDUCCION DE CALLO Y AL
CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

RESPONSE OF COMMUN BEAN (Phaseolus vulgaris) cv.
PARRAMOS TO CALLUS INDUCTION AND
CELL SUSPENSION CULTURE

1 RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la respuesta del frijol común (Phaseolus vulgaris) variedad Parramos a la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos, en la inducción de callo y cultivos de células en suspensión. Esta información es importante ya que permite iniciar a establecer las bases para el mejoramiento del frijol común utilizando cultivo de tejidos. El trabajo se dividió en las siguientes fases: a) evaluación de varias concentraciones de auxinas y tipo de explante para la inducción de callo y b) evaluación de tres auxinas para establecer suspensiones celulares.

En la inducción de callo se evaluó el efecto de diez combinaciones de las auxinas; ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido Naftalenacético (ANA); se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) para todas las combinaciones, los explantes evaluados fueron embrión, cotiledón, hipocotilo y raíz. Los tratamientos se incubaron durante un período de 15 días utilizando luz artificial con fotoperíodo de 16 horas diarias y temperatura 21 grados centígrados. En la inducción de callo el medio que contenía el 2,4-D en concentración de 3 mg/L fue el que más favoreció la formación de callo principalmente con el explante hipocotilo, el callo formado con este tratamiento presento buen peso seco, buena esponjosidad y ausencia de raíces por lo

que fue utilizado en la fase de suspensión celular. Utilizar solo el ANA no favoreció la formación de callo en ninguno de los explantes, únicamente forma raíces, dicho regulador fue eficiente solamente combinado con 2,4-D. De todos los tratamientos en los que se utilizó el explante raíz se produjo el callo de mayor friabilidad.

En la fase de suspensión celular el objetivo fue evaluar el efecto de las auxinas en la multiplicación celular utilizando el medio basal MS. Las auxinas evaluadas fueron (2,4-D), (ANA) y el Acido Indolacetico (AIA), utilizadas en concentración de 0.1 mg/L; además se utilizó un medio sin auxinas. Las suspensiones celulares se incubaron durante 22 días, bajo luz artificial con fotoperiodo de 16 horas diarias, en agitación constante de 120 revoluciones por minuto y temperatura de 21 grados centígrados.

En la suspensión celular todos los tratamientos resultaron ser estadísticamente iguales al final del período de incubación, pero el tratamiento que más favoreció la multiplicación celular fue en el que se utilizó AIA, seguido del tratamiento testigo, con la ventaja que estos tratamientos tuvieron la tendencia a formar agregados celulares con coloración verde y tendencia a la organización.

Es necesario contemplar seguimiento al presente trabajo, seguimiento que debe tomar en cuenta la evaluación de las concentraciones desde 1 hasta 3 mg/L de 2,4-D en la inducción de callo e investigar para lograr la difícil tarea de regeneración de plantas.

2 INTRODUCCION

Se estima que el frijol común (Phaseolus vulgaris) contribuye con un 26.8% de la ingesta protéinica diaria y un 13% de la ingesta calórica diaria, superado en porcentaje de calorías únicamente por el maíz, cultivo con el cual comparten la importancia en los países Centroamericanos (7). El frijol se cultiva en todas las regiones del país pero sus rendimientos son bajos principalmente por la deficiente tecnología empleada y el efecto de plagas y enfermedades en el cultivo; esto provoca que en Guatemala cada año exista un déficit en este grano básico de vital importancia.

Lo anterior ha motivado a muchos investigadores a crear variedades mejoradas y ellos han utilizado los métodos tradicionales de cruzamiento y selección, los cuales requieren tiempo y recursos considerables. Recientemente el cultivo de tejidos ha surgido como una técnica complementaria en el mejoramiento, basando su importancia en lo siguiente: a) manejar células individuales las cuales son individuos potenciales y b) poder crear variabilidad para poder seleccionar con presiones altas en corto tiempo.

El presente trabajo tiene el propósito de generar información básica en el campo de cultivo de tejidos *in vitro*, para ser incorporada posteriormente a futuros programas de mejoramiento y fue desarrollado en laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la

Universidad de San Carlos de Guatemala.

La investigación, se dividió en dos fases una de inducción de callo y otra de suspensión celular, en la cuales se utilizó como medio basal la composición de sales de Murashige y Skoog (MS); en la inducción de callo se evaluó el efecto de diez combinaciones de las auxinas 2,4-D y ANA sobre los explantes cotiledón, embrión, hipocotilo y raíz de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) variedad Parramos.

Posteriormente en la suspensión celular se establecieron cultivos de células, partiendo de los callos formados por el tratamiento de 3 mg/l de 2,4-D con el explante hipocotilo, el cual se consideró el tratamiento más apropiado para establecer dichos cultivos de células. En los cultivos de células se evaluaron las auxinas 2,4-D, ANA y AIA en concentración de 0.1 mg/l y un tratamiento sin ningún regulador del crecimiento.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No existe conocimiento de la respuesta de las variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris) que se cultivan en Guatemala a la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos. Estas técnicas pueden ser de gran utilidad para complementar programas de mejoramiento, las ventajas que se obtienen son: 1) se disminuye el tiempo y el costo necesario para formar nuevas variedades, 2) facilidad de manipulación in vitro de individuos potenciales y 3) ejercer presiones altas de selección. Lo anterior se ha demostrado en otros países para cultivos como el trigo.

La respuesta de cada uno de los genotipos al cultivo in vitro es fundamental para tomar la decisión de incorporar esta técnica a programas de mejoramiento, por eso en el presente trabajo se evalúa la respuesta a la inducción de callo de diferentes explantes de la variedad de frijol común Parramos y la respuesta de células derivadas de callo al cultivo en medios de suspensión. Es sabido que el frijol no es un cultivo de importancia para países desarrollados, por lo consiguiente no tienen interés en su investigación, por ello son los investigadores de los países en donde es importante, los obligados a la generación de información básica, que lleve a la utilización de las ventajas del cultivo de tejidos en los programas de mejoramiento

4 MARCO TEORICO

4.1 Aspectos Generales sobre Biotecnología.

Según Villalobos (19) entre los avances y desarrollos más recientes de la ciencia, la biotecnología ha logrado los de mayor importancia, principalmente en la Medicina y Agronomía. En la Agronomía los métodos modernos de la biotecnología han contribuido al incremento de la producción, a mejorar la calidad de los productos y se prevee en un corto plazo avances significativos en la resistencia a plagas y enfermedades y factores ambientales adversos. La biotecnología se define como "Cualquier técnica que utiliza organismos vivos o partes de los mismos para mejorar plantas o animales, modificar productos o desarrollar microorganismos para aplicaciones científicas".

4.2 Cultivo de Tejidos

Efferson (5) opina que algunos de los nuevos métodos que tiene la biotecnología aceleran miles de veces la tasa de las mutaciones naturales, por lo que causan variación para poder seleccionar o aceleran los cambios graduales que tienen lugar entre generaciones en las plantas. Esto se logra dándole oportunidad de formación de una planta completa a células individuales o células de la reproducción sexual. Las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos en lugar de esperar cien años o mas para que tengan lugar en forma natural o de tener que pasar por el largo y laborioso proceso de cruzar seleccionar y purificar por medio de técnicas convencionales. Por medio del cultivo de tejidos se pueden obtener variedades en corto tiempo en comparación con los métodos

tradicionales.

Según Efferson (5) el cultivo de tejidos es la técnica que más promete resultados inmediatos en la producción de variedades mejoradas de plantas, comprende el uso de técnicas que involucran la evaluación de células vegetales individuales en vez de plantas obtenidas por semilla. A diferencia de los animales las células vegetales no sexuales de muchas especies pueden estimularse mediante cierto tratamientos, de tal forma que de ellas se pueden originar plantas enteras, este fenómeno se conoce como totipotencia. En el cultivo de tejidos se utiliza de una variedad de técnicas, algunas de ellas permiten aprovechar la variación somaclonal. En este proceso se pueden obtener células vegetales individuales, manipularse por diversos medios y posteriormente obtener la regeneración de plantas; las plantulas originadas a partir de células individuales se desarrollan y llegan a producir semilla, la descendencia de estas semillas puede ser utilizada para seleccionar por productividad, resistencia a enfermedades y otras características; al comparar las plantas que pueden obtenerse de las células de una planta tienen muchas diferencias en comparación con la planta original, no se conoce claramente las razones para las variaciones entre la planta madre y su descendencia, pero este método permite seleccionar tipos mejorados entre las plantas regeneradas por cultivo de tejidos.

4.3. Importancia del Cultivo de Tejidos

Para Villalobos (18), (19) y Aguilar (1), el cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con los nuevos

métodos biotecnológicos y ofrece la oportunidad de reducir el tiempo requerido para la producción de variedades mejoradas. En la mayoría de los cultivos de importancia económica se necesitan de 7 a 10 años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras en cultivo de tejidos las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de la reducción del tiempo y el volumen de siembra en campo requeridas por los métodos convencionales.

La opinión de Efferson (5) es que el cultivo de tejidos no reemplaza completamente a los métodos convencionales, pues las grandes variaciones tienen lugar en el cruzamiento sexual, en tanto existe menos variación entre las células de una planta o variedad individual, no obstante es un buen método de complementario en un programa de mejoramiento.

4.4. Estado Actual del Cultivo de Tejidos.

Según Aguilar (1) y Siriwardana (13) en el presente muchos investigadores estudian el cultivo masivo de células en forma industrial para la producción de plantas útiles, en esto varias compañías farmacéuticas y compañías que se dedican a la Agronomía han obtenido buenos resultados. Además las técnicas del cultivo de células están siendo aplicadas a diversos campos como Genética, Morfogénesis, Fisiología, Bioquímica, Horticultura, Fitopatología y en la agricultura en general. En un futuro no muy lejano estas técnicas serán utilizadas más frecuentemente y en los más variados campos de la ciencia.

4.5 Inducción de Callo.

Villalobos (18), (19) define el callo como un tejido obtenido por medio de aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Estudios microscópicos han demostrado que los tejidos de tipo callosos generalmente son heterogéneos en su composición celular, es decir un mismo callo puede presentar varios tipos celulares.

4.5.1 Tipos de Callo

Hurtado y Merino (8) opinan que una masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según su apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas; mientras otras masas celulares forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. El callo esta generalmente constituido por una alta proporción de células en las que las vacuolas son predominantes similares a las células del parenquima.

4.5.2 Utilización del Callo

Villalobos (18) y (19) dice que una de las características más importantes del callo desde el punto de vista funcional es que a partir de células desorganizadas se tiene el potencial de desarrollar raíces, brotes y embriones dependiendo de la adición de auxinas y citoquininas en el medio, de tal manera que el callo tiene potencial de formación de

raíces (rizogénesis), formación de yemas (caulogénesis) y el proceso de desarrollo de un embrión completo y funcional a partir de una célula.

4.5.3 Factores que Influyen En El Crecimiento De Los Callos

Para Vasquez (17) y Villalobos (19) dentro los factores que influyen en el crecimiento del callo tenemos: medio de cultivo (sales minerales, vitaminas, carbohidratos, pH, reguladores del crecimiento y aditivos orgánicos), clase de tejidos y condiciones de incubación (luz y temperatura).

4.5.4 Medio de Cultivo

Hurtado y Merino (8) y Villalobos (18) indican que el éxito del cultivo de tejidos de plantas está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes así como su forma química adecuada se han establecido cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Villalobos (18) indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macronutrientes como los son, las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, cobre, molibdeno y cobalto. Un medio de cultivo contiene estos elementos y carbohidratos, normalmente sacarosa, este último compuesto sirve para reemplazar al carbono que la planta normalmente fija por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en

pequeñas cantidades tales como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento.

Aguilar (1) ha dividido los componentes del medio de cultivo en las siguientes categorías.

- Sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes)
- Fuente de energía y de carbono para metabolismo, generalmente es un azúcar
- Reguladores del crecimiento
- Complejos orgánicos (vitaminas y fuente de nitrógeno reducido)
- gelificante
- otros compuestos como leche de coco por ejemplo

4.5.4.A Sales Inorgánicas

a. Macronutrientes. estos son importantes en el crecimiento y desarrollo celular, un medio de cultivo consta de los siguientes macronutrientes:

- Nitrógeno se adiciona en grandes cantidades en forma de nitrato o iones de amonio o combinando ambas formas.
- Magnesio y Azufre se adicionan normalmente en forma de sulfato de magnesio.
- Fósforo se adiciona en cualquiera de las formas siguientes: fosfato ácido de sodio monohidratado y fosfato ácido de potasio.
- Potasio se agrega en cualquiera de las formas siguientes: cloruro de potasio, nitrato de potasio, fosfato ácido de

potasio.

- Calcio se adiciona en cualquiera de las siguientes formas:
cloruro de calcio dihidratado, nitrato de calcio.

b. micronutrientes Aguilar (1) y Villalobos (18) dicen que estos son necesarios ya que son componentes de las proteínas de las células vegetales y tienen importancia a nivel fisiológico y metabólico.

- Hierro. se añade en forma de quelatos de hierro, puesto que de la forma sulfato precipita y no es disponible a las células
- Manganeso. importante en la actividad fotosintética ya que cuando este elemento no se encuentra presente disminuye la actividad fotosintética.
- Zinc y Cobre. Son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.
- Cobalto. es un metal componente de la vitamina B 12
- Boro. necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática.

4.5.4.B Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las más usadas son:

- Tiamina, conocida como vitamina B1, se añade como tiamina ácida de cloro (Tiamina. HCl) en cantidades que varían de 0.1 a 0.3 mg/L está es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.

- Vitamina E, está ayuda en la formación de callos que provienen de embriones

4.5.4.C Azúcares

Aguilar (1) dice que la mayoría de los cultivos in vitro son heterótrofos y requieren de una fuente de carbohidratos para obtener la energía necesaria para su crecimiento y desarrollo. La sacarosa es la principal fuente de azúcares, aunque en ciertos cultivos se usan otros azúcares como la glucosa ya que una disminución en la concentración en el medio favorece la restauración de la capacidad organogénica de los cultivos, al aumentar su concentración en el medio actúan como regulador osmótico y al disminuirla se limita la fuente artificial de carbono.

4.5.4.D Compuestos Indefinidos y Aminoácidos

Villalobos (18) ha encontrado que existen numerosos complejos nutritivos como el hidrolizado de caseína (fuente de nitrógeno), el agua de coco por su alto contenido de citocininas, el extracto de malta y el extracto de levadura que se usan en los medios de cultivo, sin embargo existen problemas sobre el crecimiento en cuanto a la variación que provocan. Los aminoácidos proveen a las células vegetales de nitrógeno inmediatamente disponible y su absorción puede ser mucho más rápida que la del nitrógeno inorgánico del mismo medio de cultivo, pero su presencia no sustituye a este último. Algunos aminoácidos de uso frecuente son Arginina, el Acido Glutámico, el Acido Aspartico y la Tirosina.

4.5.4.E Reguladores del Crecimiento

Hurtado y Merino (8) y Weaver (20) reportan que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, como es incrementando el contenido osmótico de las células y la permeabilidad de la membrana al agua, reduciendo la presión de la pared y aumentando la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), enzimas y aún de la misma pared lo que provoca aumento en la plasticidad de la pared celular, que trae como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento. Villalobos (18) reporta que las auxinas, ácido Indolebutírico (AIB) y el ácido Indolacético (AIA) son usadas en rango que varía de 0.1 a 10 mg/L; el ácido Naftalenacético (ANA), ácido paraclorofenoxiacético y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) se usan en rangos de 0.001 a 10 mg/L. La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la manera siguiente 2,4-D tiene mayor actividad que ANA, el cual a su vez tiene mayor actividad que AIB, que su actividad es mayor que AIA.

Según Hurtado y Merino (8) las citocininas también promueven la división celular y la organización de callos, se utiliza principalmente la Benciladenina (BA), Kinetina, Zeatina y Bencil Amino Purina (BAP).

4.5.4.F.a Importancia de los Reguladores del Crecimiento en los Medios de Cultivo.

Hurtado y Merino (8) reporta que los reguladores del crecimiento juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y células. En la actualidad se reconoce que

la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas está mediada por los reguladores del crecimiento, las cuales son sustancias mensajeras, la mayoría de las veces activas en muy pequeñas cantidades, en las que los lugares de acción y de síntesis son distintos, siendo en algunos casos activos en el mismo sitio de síntesis, puede además influir en múltiples procesos totalmente distintos al mismo tiempo y en partes diferentes de la planta.

Según Thorpe (14) el balance de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo determinará la formación de brotes, raíces, embriones o la continua proliferación del callo. Cuando la concentración de citoquininas es mayor que la auxina entonces se iniciarán las yemas de brotes, pero si la auxina es la mayor concentración entonces se desarrollarán los primordios radicales y la concentración equilibrada de ambos inducirá el incremento del callo.

4.5.4.F.b Uso de Algunas Auxinas en Cultivo de Tejidos

Hurtado y Thorpe (8, 14) indican que los reguladores del crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo de callo son Acido Indol 3 Acetico (AIA), Acido Naftalenacetico (ANA) y el Acido 2,4-Diclorofenoxiacetico, en concentraciones desde 0.1 a 10.0 mg/l; para cada especie e incluso para cada cultivar existen fitohormonas y una concentración balanceada para la inducción y mantenimiento del cultivo. El máximo tamaño del callo se alcanza a las 3 u 8 semanas, a esta edad se debe efectuar los subcultivos, y a cada 2 o 6 semanas se transfieren a medio fresco para evitar su debilitamiento en el crecimiento y lograr su supervivencia. La

multiplicación y crecimiento celular son acelerados, provocando gasto de nutrientes del medio, así mismo el agua se evapora dejando al medio deshidratado.

Vásquez (17) ha encontrado que cuando se utiliza ácido Naftalenacetico (ANA) como única fuente de auxina para inducir la formación de callo en anteras es posible rediferenciar plantas en el mismo medio de inducción, este tratamiento ofrece la ventaja de evitar la transferencia de los callos a un nuevo medio sin auxina para inducir la rediferenciación de órganos y plantas. Lo anterior se explica posiblemente por una menor actividad auxínica del ácido Naftalenacetico inhibiendo en menor grado y menos irreversiblemente la capacidad organogénica de las células del callo.

4.5.4.G Otros Componentes del Medio de Cultivo

Aguilar (1) y Villalobos (18) reconocen que existen otros componentes de los medios de cultivo, que son importantes como por ejemplo el agua, el agente gelificador si es medio sólido y el pH.

4.5.4.G.a El pH

Aguilar (1) opina que el pH debe oscilar entre 5.6 a 5.8, este tiene influencia en el condicionamiento de que sales permanecen solubles en el medio y además influye en la asimilación de los nutrientes del medio.

4.6 Tejido Vegetal como Factor de Crecimiento de Callo

4.6.1 Tipo de Planta

Villalobos (18), (19) reconoce que el tipo de planta es determinante para el éxito del cultivo in vitro, los tejidos de Gimnospermas son más difíciles de cultivar que los de Angiospermas; dentro de las Angiospermas el material derivado de las dicotiledoneas puede ser cultivado con mayor facilidad que las monocotiledoneas.

4.6.2 Parte de la Planta

Según Vásquez (17) se puede iniciar cultivo de callo a partir de cualquier órganos vegetal (hojas, raíz, polen, embriones y semillas o cualquiera de sus partes). Sin embargo Villalobos (18) recomienda comparar sistemáticamente varias partes del vegetal antes de decidirse por alguno de ellos.

4.6.3 Edad de la Planta

Vásquez (17) dice que la edad de la planta es muy importante por estar asociada con el estado fisiológico de la planta aunque deben tomarse en cuenta también la sanidad de la planta, es recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo, aunque se pueden obtener buenos resultados con plantas adultas.

4.6.4 Tamaño y Forma del Explante

Para Vásquez (17) y Villalobos (18) el tamaño y forma del explante no son importantes, aunque explantes muy pequeños pueden tener baja respuesta, siendo recomendable utilizar fragmentos de tejidos de 5 a 10 mm. por lado pues con ello se incrementa la posibilidad de éxito del cultivo.

4.7 Condiciones de Incubación

Villalobos (18) considera que los cultivos se deben incubar bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

4.8 Iniciación del Cultivo

Vásquez (17) indica que la iniciación de un cultivo de callos ocurre cuando el explante estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga su crecimiento y una división celular continua. Por si mismos los vegetales tienen un potencial endogeno para la formación de callo, en su medio natural al sufrir una lesión esta es reparada por los tejidos, las especies presentan variación en la capacidad de respuesta, la misma que se refleja en la respuesta in vitro a la inducción de callo, encontrándose tejidos para los cuales la inducción de callo es requisito previo el suplemento de auxina, un regulador del crecimiento. Otros tejidos requieren solo una citocinina o un suplemento tanto de auxina como de citocinina o bien necesitan complejos naturales en el medio.

Por lo general el callo toma de 3 a 8 semanas para alcanzar el tamaño suficiente para efectuar un subcultivo, la falta de transferencia causa debilitamiento y muerte del tejido, esto es debido a que el crecimiento y la división celular son acelerados, lo que provoca el consumo de los nutrientes del medio, además debido a la evaporación del medio solido hay deshidratación y la acumulación de metabolitos puede llegar a ser tan alta que pueden provocar toxicidad en el tejido.

4.9 Cultivo de Callos en Frijol

Evans (6) ha encontrado que se han establecido cultivos de callos de frijol en diferentes medios con gran concentración de sales usando medios basales como los de Murashige y Skoog (MS), White y Gamborg. Algunos investigadores desarrollaron callo derivados de explantes de raíz, hipocotilo y cotiledones de plantas en crecimiento, los reguladores del crecimiento utilizados en los medios de inducción de callos fueron ácido 2,4-D, Picloram y ANA en concentraciones que varían de 1 hasta 100 mg/L.

Liau y Boll (9) iniciaron cultivo de callo en frijol utilizando secciones de 10 mm. de longitud de raíz e hipocotilo obtenidas de semillas germinadas en condiciones estériles, el cultivo se obtuvo en erlenmeyer de cuello angosto de 125 ml usando 20 ml de medio sólido. Utilizaron una variedad de medios con una serie de derivaciones, principalmente de compuestos orgánicos. El mejor crecimiento de callo de frijol lo obtuvieron en un medio que tiene como base la composición de sales de Murashige y Skoog, en este medio los cultivos de callo fueron mantenidos y subcultivados por un intervalo largo de tiempo.

Tonin y colaboradores (15) tuvieron éxito en la formación de callo cuando en el medio de cultivo se agregó los reguladores del crecimiento Ácido Indolácetico, Ácido Naftalenácetico, Ácido 2,4-Diclorofenoxiácetico y Kinetina.

Martins y Sondal (10) indujeron formación de callo utilizando meristemas apicales de varios cultivares de frijol, utilizaron el medio de Murashige y Skoog con los reguladores kinetina, 2,4-D y AIA, el callo producido con los 36 materiales fue transferido a medio líquido

con composición de sales de PC-L2 con 2,4-D y Caseína hidrolizada, estos materiales tuvieron diferente comportamiento. La influencia del genotipo fue importante y otra variable que influyó en la respuesta fue el tamaño inicial del explante y el medio de cultivo.

Según Crocomo y colaboradores (3) es posible inducir formación de callo en variedades de frijol si se le agrega al medio leche de coco, Acido Naftalenacetico y 2,4-D. Se ha demostrado que el 2,4-D es efectivo en el crecimiento de callos de frijol, este regulador del crecimiento es más efectivo que el AIA o el ANA.

4.10 Suspensión Celular

4.10.1 Definición de un Cultivo Celular

Hurtado y Merino (8) definen el cultivo de células en suspensión como "conjunto de células aisladas así como de pequeños agregados celulares distribuidos en un medio líquido en constante agitación. El cultivo de células en suspensión fue ideado con base en métodos microbiológicos".

4.10.2 Características de un cultivo de Células

Hurtado y Merino (8), Villalobos (18) y Thorpe (14) coinciden en que el cultivo de células en suspensión es "un medio líquido en donde existe constante movimiento del medio utilizando agitación o burbujeo de unidades pequeñas de células o células aisladas que ayuda al intercambio de nutrientes y gases. Los cultivos en suspensión tienen una tasa de crecimiento mayor que el cultivo de callos debido a un mayor intercambio de nutrientes y gases".

4.10.3 Usos del Cultivo de Células

Hurtado y Merino (8) indican en relación al cultivo en suspensión "este sistema es utilizado con éxito para llevar a cabo estudios sobre embriogénesis, crecimiento, diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición y metabolismo.

4.10.4 Obtención de un Cultivo de Células

Villalobos (18) ha logrado cultivo de células cuando se inocula callo en medio líquido y se mantiene en agitación continua, las células se separan del tejido formando una suspensión constituida por células individuales o por pequeños agregados celulares. El establecimiento de los cultivos en suspensión dependen en gran medida del grado de disgregabilidad (friabilidad) del callo.

Generalmente la friabilidad del callo puede aumentarse con altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo. En ciertas condiciones aparecen zonas o regiones disgregables en callos compactos que pueden ser utilizados también para el establecimiento posterior de las suspensiones. La suspensión también puede iniciarse de explantes primarios de tejidos diferenciados pero el establecimiento es más lento y existe alto riesgo de contaminación.

4.10.5 Definición de la friabilidad del callo y su importancia en el Cultivo de Células.

En cuanto al término friable Hurtado y Merino (8) indican que el término se emplea para describir la capacidad de separación de las células, es decir, que estas se disgregan fácilmente después de una

división celular, por consiguiente un cultivo que presenta un alto porcentaje de células tanto aisladas como en pequeños agregados formará una buena suspensión, Se dice que un callo friable tiene buen consistencia y se puede identificar por su apariencia, lo contrario de un callo friable (de buena consistencia) es un callo duro o compacto el cual también se puede conocer por su apariencia.

4.10.6 Crecimiento de Células en Suspensión

Dodds y Roberts (4) y Hurtado y Merino (8) opinan que en un cultivo de células en suspensión pasa por varias fases antes de llegar a agotar los nutrientes del medio y por lo tanto ya no crecen a menos que se practique un subcultivo, las fases son las siguientes:

- a. Fase de reposo: el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales.
- b. Fase exponencial: en esta fase se activa la división celular y en poco tiempo crece en forma acelerada la cantidad de células.
- c. Fase lineal: en esta fase la población de células crece proporcionalmente al tiempo de manera que este crecimiento se comporta gráficamente como una recta.
- d. Fase estacionaria: en esta fase la velocidad de crecimiento es igual a cero a causa de agotamiento de los nutrientes o al menos uno de ellos en esta fase las células han alcanzado su máxima densidad celular permanecen viables pero no se dividen aunque si no se subcultivan pueden morir.

La mayoría de los cultivos en suspensión alcanzan su máxima

densidad celular entre los 18 y 25 días aunque puede existir cultivos extremadamente activos que pueden alcanzar entre 6 y 9 días su máxima densidad.

4.10.7 Morfología de las Células que Crecen en Suspensión

Hurtado y Merino (8) han encontrado que los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, así como su tamaño dependen de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, de la edad del tejido en cultivo, de la composición del medio y de las condiciones de incubación. En la mayoría de los cultivos el 60% de las células pueden estar aisladas o formar agregados de varias células, en un mismo cultivo existe una variedad de formas de células y de tamaños, las dimensiones varían de 20 a 40 micras de diámetro y de 30 a 200 micras de longitud, las células presentan una pared celular delgada de 0.2 a 0.6 micras, no especializada que rodea el protoplasto.

4.10.8 Medición del Crecimiento Celular en un Cultivo

Hurtado y Merino (8) indican que "para medir el crecimiento de las células, este puede expresarse de manera cualitativa pues conforme las células se multiplican se observará un aumento en la turbidez del medio de cultivo de tal forma que un cultivo con baja densidad celular será claro, con el color normal del medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento también se puede expresar cuantitativamente mediante la determinación periódica de parámetros específicos de crecimiento, los parámetros más usados son:

a. el peso fresco y seco de las células cultivadas.

b. el número de células por unidad de volumen cuantificadas con ayuda de un hematocitómetro.

c. el volumen total ocupado por las células en una alicuota del cultivo, las células se compactan mediante centrifugación y el volumen de estas se expresa en un porcentaje del volumen de la alicuota.

4.10.9 Aplicación del Cultivo de Células

Villalobos (18) ha encontrado la aplicación de la metodología del cultivo de células, pues se forman células separadas o bien agregados celulares, que se pueden transferir a un medio sólido donde se pueden aislar células mutantes y estas pueden formar callosidades que pueden a su vez regenerar tejidos, órganos o plantas completas en presencia de reguladores del crecimiento. La metodología del cultivo también es favorable para hacer crecer en el cultivo hongos que causan enfermedades y luego regenerar las células que hayan resistido el ataque con la seguridad de la planta regenerada será resistente a el ataque del hongo, aunque es necesario crear metodologías para lograr establecer un cultivo de células en suspensión.

4.11 Cultivo de Células en Suspensión en Frijol (Phaseolus vulgaris)

Liau y Boll (9) establecieron cultivos en suspensión iniciados al transferir varias porciones de callo friables (aproximadamente 2 gramos de peso fresco), producido por raíces, hipocotilo o cotiledón a 50 ml de medio líquido en un erlenmeyer de 250 ml, este fue agitado en un agitador rotativo de 100 a 120 revoluciones por minuto, con temperatura

aproximada de 27 grados centígrados. Mas del ochenta por ciento de las células estaban aisladas, el resto fueron grupos de células de 5 a 50 células, los subcultivos se establecieron al transferir 5 ml de células filtradas en una malla y luego pasadas a un medio de suspensión nuevo.

4.12 Algunos Estudios en la Organización de Callos en Frijol

Tonin (15) en sus estudios sobre organización ha encontrado que el nitrógeno reducido estimula el desarrollo y morfogénesis cuando se agrega al medio nutritivo como una mezcla de aminoácidos, tal como caseína hidrolizada y la leche de coco pueden sustituir el efecto de los aminoácidos en cultivos en suspensión celular.

Los resultados demuestran que los aminoácidos si tienen efecto en la morfogénesis de los callos. Los aminoácidos que más favorecen la morfogénesis son Arginina, Acido Aspartico y Cisteina, estos compuestos provocan la presencia de regiones pigmentadas verdes en el callo, los tres aminoácidos ya sea individualmente o en grupos de 2 o 3 fueron eficientes.

Arias y Crocomo (2) encontraron que en callos de frijol el aminoácido que más favorece la rizogenesis es la Arginina en concentración de 120 a 240 mg/L. El hidrolizado de caseína también tiene efecto en la morfogénesis en callos de frijol.

Tonin (15) encontro que algunos aminoácidos son inhibitorios para el desarrollo y morfogénesis de los callos de frijol, éstos aminoácidos son Acido Glutamico, Glicina e Histidina.

Peters, Crocomo y Sharp (12) demostraron el efecto de algunos alcaloides en particular la nicotina, que pueden servir como promotores morfogeneticos en los sistemas de cultivo de tejidos, principalmente en aquellas especies donde la morfogénesis no se ha logrado con el manejo de las relaciones auxina-citocinina; como es el caso del frijol.

La Nicotina y Cafeina a demostrado mejorar tanto el desarrollo del callo como la morfogenesis.

5 OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de 10 combinaciones de auxinas, en la inducción de callo en cuatro explantes de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) variedad Parramos.
2. Evaluar la respuesta de cuatro explantes de frijol (Phaseolus vulgaris L.) variedad Parramos, a la inducción de callo.
3. Evaluar el efecto de tres auxinas en "el" cultivo en suspensión celular, partiendo de callos de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) variedad Parramos.

6 HIPOTESIS

1. Las 10 combinaciones de auxinas tienen el mismo efecto en la inducción de callo, independientemente del tipo de explante utilizado.
- 2 Los explantes cotiledón, hipocotilo, embrión y raíz de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) variedad Parramos responden de igual manera a la inducción de callo, independientemente de la combinación de auxinas utilizada en el medio de inducción.
- 3 Las tres auxinas a evaluar en el cultivo en suspensión celular tienen la misma eficiencia en la multiplicación celular.

7 METODOLOGIA

7.1 Descripción del Area en Dónde se Realizó la Investigación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, localizado en la ciudad Universitario zona 12.

7.2 Material Vegetal

La variedad de frijol Parramos fue la que se utilizó en el presente estudio, esta variedad tiene las siguientes características:

Es una variedad de frijol negro, se puede cosechar de 115 a 120 días después de la siembra, su hábito de crecimiento es indeterminado arbustivo, con un promedio de 18 vainas por planta y 6 semillas por vaina, la forma de la semilla es alargada, tiene las vainas uniformemente distribuidas, presenta resistencia a la siguientes enfermedades: Antracnosis (Colletotrichum lindemutianum), Roya del frijol (Uromyces Phaseoli) y mancha angular (Isariopsis griseola); esta variedad fue desarrollada para el altiplano central y occidental de Guatemala y su promedio de rendimiento es de 1500 Kilogramos por hectárea.

7.3 Desarrolló de la Investigación

La investigación se dividió en las siguientes fases:

- a. Evaluación de medios de inducción de callo y respuesta del tipo de explante.
- b. Evaluación de medios para cultivo de células en suspensión celular

7.3.1 Evaluación de medios de inducción de callo

7.3.1.A Diseño experimental.

Se utilizó el diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones. Las repeticiones se constituyeron en bloques por la gradiente de variabilidad constituida por la iluminación

7.3.1.A.a Tratamientos

Los tratamiento evaluados son el resultado del arreglo de dos factores; el factor A con 10 niveles que corresponden a 10 combinaciones de auxinas las que se pueden ver en el cuadro 1 y el factor B con 4 niveles que corresponden a 4 tipos de explante los cuales se presentan en el Cuadro 2; la combinación de los dos factores resultó en 40 tratamiento evaluados.

Cuadro 1. Combinaciones de las auxinas 2,4-D y ANA, utilizadas en el estudio de inducción de callo en explantes de frijol común (Phaseolus vulgaris) Var. Parramos.

Nivel	Concentración de auxinas mg/L	
	2,4-D	ANA
A1	1	0
A2	3	0
A3	5	0
A4	0	1
A5	0	3
A6	0	5
A7	2	1
A8	1	2
A9	3	2
A10	2	3

Cuadros 2. Tipos de explante de frijol (Phaseolus vulgaris L.) utilizados en la inducción de callo.

Nivel	Explante
B1	Embrión (W)
B2	Cotiledón (X)
B3	Hipocotilo (Y)
B4	Raíz (Z)

7.3.1.A.b Unidad Experimental

Se consideró como una unidad experimental una caja de petri de 100x15 mm donde se agregaron 20 mililitros de medio y se colocaron cuatro explantes. Con los 40 tratamiento y 4 repeticiones se manejó en total 160 unidades experimentales. Se hicieron observaciones en estas unidades experimentales, producto de esto se eliminaron 30 tratamientos por que no respondieron a la inducción de callo, perdiéndose la estructura factorial, por lo que los 10 tratamientos que respondieron se manejaron como un experimento simple el cual tuvo 40 unidades experimentales, producto de 10 tratamientos y 4 repeticiones, se colocaron 5 cajas de petri adicionales para poder realizar lecturas a los 5, 10 y 15 días posterior a la siembra y conocer el comportamiento de la formación del callo a través de las variables medidas y garantizar al final tener el número normal de unidades para realizar los análisis estadísticos.



7.3.1.B Variables Evaluadas

Se determinó el peso fresco y seco del callo producido más el explante.

Se estimo la esponjosidad (consistencia) del callo producido,

esto se hizo por estimación visual 15 días después de la siembra de los explantes.

Se observó la presencia de raíces 15 días después de la siembra de los explantes.

7.3.1.C Análisis de la Información

Se realizó un análisis de Covarianza (ANCOVA) para determinar si existía efecto del peso seco inicial de los explantes sobre el peso final del explante más el callo formado.

El modelo que se utilizó para este análisis es el siguiente:

$$Y_{ijk} = U + T_i + B_j + S(X_{ijk} - X) + E_{ijk}$$

dónde:

U = media general

Y_{ijk} = peso seco del explante más el callo formado

T_i = efecto de los tratamientos

B_j = efecto de los bloques

$S(X_{ijk} - X)$ = efecto del peso seco inicial de los explantes.

E_{ijk} = error experimental.

También se realizó un análisis de Varianza para la formación de callo exclusivamente, es decir obteniendo matemáticamente la formación de callo restando el peso seco final del callo formado más el explante menos el peso seco inicial del explante, el modelo utilizado es el siguiente.

$$Y_{ijk} = U + T_i + B_j + E_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = variable respuesta (peso seco del callo formado)

U = efecto de la media general

T_i = efecto de los tratamientos

B_j = efecto de los bloques

E_{ijk} = error experimental

También se realizaron pruebas múltiples de medias (Tukey 5%) para encontrar las diferencias estadísticas entre los promedios de peso seco de los diferentes tratamientos.

Para las variables cualitativas Consistencia del callo y Ausencia de raíces, se realizó una prueba de Friedman.

7.3.1.D Manejo del Experimento

7.3.1.D.a Preparación de Medios de Cultivo

La composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (se presentan en el Apéndice 1) y los reguladores del crecimiento se prepararon en soluciones de concentración conocida (soluciones Stock).

El procedimiento utilizado fue: en un balón aforado de capacidad 1000 ml se colocó 200 ml de agua destilada, luego se agregaron todas las soluciones de los componentes del medio de cultivo, posteriormente la sucrosa, agitando el medio hasta que se disolvió completamente y luego se aforó con agua destilada a 1000 ml.

Luego se vació el contenido en un beaker de 1000 ml. y se determinó el pH, el cual se ajustó con ácido clorhídrico 1N o con hidróxido de sodio 1N. El medio fue calentado para facilitar la disolución del agar y posteriormente se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 121 grados centígrados y 15 p.s.i por quince minutos

7.3.1.D.b Transferencia del medio.

Ante la dificultad de autoclavar el medio de cultivo en las cajas de petri directamente, las cajas se autoclavearon por separado y el medio se autoclaveó en earlenmeyers con tapones de papel aluminio y luego se traspasó a las cajas de petri esterilizadas en la cámara de flujo laminar.

7.3.1.D.C Obtención de Explantes

7.3.1.D.C.I Obtención de Embriones

El procedimiento para la obtención de embriones de frijol fue el siguiente: Se lavaron las semillas de frijol con agua del grifo, eliminando las semillas que flotaban o que estaban dañadas por insectos principalmente, luego se esterilizaron las semillas con una solución al 2.5% de Hipoclorito de Sodio durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada esterilizada tres veces. Después de la ultima lavada se dejaron en remojo por 24 horas en agua esterilizada. Transcurrida las 24 horas se lavaron nuevamente con agua destilada esterilizada. En la cámara de flujo laminar se removió la testa de la semilla y se separaron los cotiledones, para obtener el embrión completo con la ayuda de una aguja de disección.

7.3.1.D.C.II Procedimiento para Obtener Cotiledón, Hipocotilo y Raíz

El procedimiento utilizado para obtener estos explantes fue el siguiente: Veinticuatro horas antes del siguiente paso se preparó una solución de agar al 7%, de esta solución se agregaron 35 ml a erlenmeyers de 250 ml de capacidad, luego se esterilizó en autoclave. Posteriormente se lavaron las semillas de frijol con agua de grifo y se eliminaron las dañadas por insectos o que flotaban, luego se esterilizaron las semillas con una solución al 2.5% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos y utilizando agitación continua, luego en la cámara de flujo laminar se lavaron tres veces las semillas con agua destilada estéril y se colocaron en los earlenmeyers conteniendo la solución de agar previamente preparada. Transcurridos tres días las semillas estaban en proceso de germinación, con el hipocotilo diferenciado de la radícula, en este momento se obtuvieron estos explantes y el cotiledón.

7.3.1.D.d Proceso de Siembra

Este procedimiento estuvo restringido a la cámara de flujo laminar, fue allí donde se llevó el explante al medio de inducción de callo, con asepsia tanto del personal como del equipo utilizado.

7.3.1.D.e Condiciones de Incubación

Las condiciones de incubación para la inducción de callo fueron las siguientes: luz artificial con fotoperíodo de 16 horas y temperatura de 21 grados centígrados, durante 15 días.

7.3.2 Suspensión Celular

7.3.2.A Diseño Experimental

El diseño experimental utilizado fue el de bloques al azar con cuatro repeticiones, las cuales por la existencia de una gradiente de variabilidad que fue la iluminación se convirtieron en bloques.

7.3.2.A.a Tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron 4, éstos son el producto de la evaluación de tres auxinas en concentración de 0.1 mg/L y un testigo en el cual no se aplicó ninguna auxina al medio de cultivo. Para todos los tratamientos el medio basal utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS). las auxinas evaluadas se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3 Auxinas utilizadas en el estudio de cultivos de suspensión celular en callos de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)

Tratamiento	Auxinas
A	ninguna
B	Acido 2,4-Diclorofeniacetico
C	Acido Naftalenacetico
D	Acido Indoleacetico

7.3.2.A.b Unidad Experimental

Se consideró como unidad experimental un erlenmeyer de 250ml. de capacidad, el cual contenía 50 ml de medio liquido. De los cuatro tratamientos y cuatro repeticiones resultaron las 16 unidades experimentales manejadas.

7.3.2.B Fuente de Células

El tratamiento que en la inducción de callo se consideró el mejor en base a peso seco, friabilidad y presencia de raíces; fue el que se utilizó como fuente de células. Este se reprodujo lo suficiente para lograr establecer los cultivos de suspensión celular.

7.3.2.C Variable Respuesta y Forma de Medirla

La variable que se evaluó fue el número de células por mililitro, esto se realizó de la manera siguiente

- 1) En la cámara de flujo laminar se tomaron muestras de 1 centímetro cúbico de cada unidad experimental, esto se realizó utilizando una pipeta de 1 centímetro cúbico esterilizada, esta muestra fue colocada en un tubo de ensayo debidamente identificado.
- 2) De la muestra obtenida se colocó una gota en el hematocímetro del cual ya se conocía que tenía capacidad de 0.676 milímetros cúbicos y con la ayuda de un microscopio se realizó el conteo del número de células en el volumen conocido y se extrapoló para un centímetro cúbico, para este caso el número de células en el volumen del hematocímetro se multiplicó por la constante de 1,479 para obtener el número de células por centímetro cúbico.

7.3.2.D Análisis de la Información

Se realizó un análisis de Covarianza (ANCOVA) debido a que se colocó un número diferente de células en cada unidad experimental, el modelo del análisis de covarianza se presenta a continuación.

$$Y_{ijk} = U + T_i + B_j + S(X_{ijk} - \bar{X}) + E_{ijk}$$

donde:

U= media general

Y_{ijk} = cantidad de células por centímetro cúbico

T_i = efecto de las auxinas

B_j = efecto de los bloques

$S(X_{ijk} - \bar{X})$ = efecto del número inicial de células por mililitro

E_{ijk} = error experimental

El análisis de ANCOVA encontró efecto del número inicial de células sobre el número final de células, por lo que se realizó la corrección de las medias de los tratamientos para posteriormente aplicar una prueba de múltiple de medias (Tukey 5%).

7.3.2.E Manejo del Experimento

7.3.2.E.a Preparación de Medios

Este procedimiento es similar al que se utilizó para la preparación de medios en la fase de inducción de callo del presente trabajo, con las diferencias siguientes: se preparó medio líquido y por lo tanto no se le agregó agar, se esterilizó en el autoclave directamente en los erlenmeyers con tapones de algodón y papel aluminio y por supuesto las auxinas y la concentración de ellas.

7.3.2.E.b Procedimiento de Siembra

Los callos fueron disgregados en una caja de petri con la ayuda de un bisturi, posteriormente con una pinza la masa callosa fue llevada a los earlenmeyers que contenían el medio líquido previamente preparado,

estos se taparon con algodón y papel aluminio para lograr un buen aislamiento. Este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar y fue necesaria una completa asepsia del personal como del equipo.

7.3.2.F Condiciones de Incubación

A los earlenmeyers que contenían las células se les incubó en fotoperiodo continuo a 2000 lux, con temperatura de 21 grados centígrados y en agitación de 120 revoluciones por minuto.

8 RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Fase de Inducción de Callo:

- En la inducción de callo de los 40 tratamientos iniciales se eliminaron 30 porque no formaron callo, la mayor parte correspondió a los medios de inducción de callo que contenían únicamente Acido Naftalenácetico (ANA) como regulador del crecimiento, en estos tratamientos la única respuesta que se obtuvo fue la formación de raíces (rizogénesis) como es característico de los reguladores del crecimiento tipo auxina. El ácido naftalenácetico fue eficaz en la inducción de callo solamente combinado con Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), la respuesta de los 40 Tratamientos se resume en el Cuadro 4.

Cuadro 4 Respuesta de los 40 tratamientos en la fase de inducción de callo, utilizando explantes de frijol (Phaseolus vulgaris) var. Parramos

tratamiento			peso en grámos	
Auxina mg/l		Explante	fresco	seco
2,4-D	ANA			
1	0	Embrión	0.8339	0.03835
1	0	Cotiledón	-	-
1	0	Hipocotilo	-	-
1	0	Raíz	-	-
3	0	Embrión	- 0.5132	0.03005
3	0	Cotiledón	0.6764	0.05810
3	0	Hipocotilo	0.8526	0.04593
3	0	Raíz	0.1955	0.01380
5	0	Embrión	-	-
5	0	Cotiledón	-	-
5	0	Hipocotilo	-	-
5	0	Raíz	-	-
0	1	Embrión	-	-
0	1	Cotiledón	-	-
0	1	Hipocotilo	-	-
0	1	Raíz	-	-

continuación del cuadro 4

Tratamiento			peso en grámos	
Auxina mg/l		Explante	fresco	seco
2,4-D ANA				
0	3	Embrión	-	-
0	3	Cotiledón	-	-
0	3	Hipocotilo	-	-
0	3	Raíz	-	-
0	5	Embrión	-	-
0	5	Cotiledón	-	-
0	5	Hipocotilo	-	-
0	5	Raíz	-	-
2	1	Embrión	0.04555	0.02608
2	1	Cotiledón	-	-
2	1	Hipocotilo	0.7108	0.03885
2	1	Raíz	0.3902	0.02202
1	2	Embrión	-	-
1	2	Cotiledón	-	-
1	2	Hipocotilo	-	-
1	2	Raíz	-	-
3	2	Embrión	-	-
3	2	Cotiledón	-	-
3	2	Hipocotilo	0.7809	0.03765
3	2	Raíz	0.2809	0.01543
2	3	Embrión	-	-
2	3	Cotiledón	-	-
2	3	Hipocotilo	-	-
2	3	Raíz	-	-

Unicamente 10 tratamientos respondieron a la inducción de callo, los cuales se presentan en el cuadro 5. En dichos tratamientos mediante el análisis de covarianza se encontró efecto del peso seco del explante sobre el peso seco final del callo formado más el explante, por lo que fue necesario realizar un ajuste a las medias de los tratamientos para realizar la prueba discriminatoria de medias. En el Apéndice 4 se muestra el resumen del análisis de Covarianza.

Cuadro 5 Tratamientos que respondieron a la inducción de callo, medias obtenidas y medias corregidas por el análisis de covarianza para el peso seco del callo formado más el explante utilizado.

Tratamiento			Medias de los trat.		tukey 0.05%
Explante	Auxina mg/L		Obtenida	corregida	
	2,4-D	ANA			
Cotiledón	3	0	0.5810	0.06500	A
Hipocotilo	3	0	0.4593	0.04500	A
Hipocotilo	2	1	0.0385	0.03800	A
Embrión	1	0	0.0383	0.03740	A
Hipocotilo	3	2	0.0376	0.03700	A
Embrión	3	0	0.0305	0.02900	AB
Embrión	2	1	0.0260	0.02500	BC
Raíz	2	1	0.0220	0.02000	BCD
Raíz	3	2	0.0154	0.01400	CD
Raíz	3	0	0.0138	0.01200	D

Entre los mejores tratamiento según la prueba de Tukey (5%) se encuentra el tratamiento en el cual se utilizó el explante cotiledón en el medio de inducción de callo que contenía 3 mg/L de 2,4-D; este tratamiento al final del período de inducción presento los siguientes pesos: El valor del peso fresco fue de 0.6764 gramos y el valor del peso seco fue de 0.05810 gramos, y la media corregida por el análisis de covarianza tuvo un valor de 0.065. A pesar de tener un aceptable peso tanto seco como fresco el callo no fue utilizado en la fase de suspensión celular por las causas siguientes:

1) el peso seco inicial del explante (cotiledón) fue el más alto en comparación con los demás explantes utilizados, esto se puede confirmar cuando se observa la figura 1, en esta figura la primer división de las barras corresponde al peso seco del explante al momento de la siembra.

2) los incrementos logrados por este tratamiento durante los 15 días de inducción son mínimos, así se puede observar en esa misma figura 1, que la barra que representa este tratamiento no presenta la cuarta división como las demás, lo que indica que el callo a partir del décimo día ya no creció. Este comportamiento parece tener la explicación en el hecho que el cotiledón es un tejido de reserva y aunque es un tejido vivo la actividad celular se encuentra reducida al mínimo y por lo tanto no se obtiene respuesta a la inducción al aplicar exogenamente reguladores del crecimiento tipo auxinas; y 3) Al aplicar un análisis de varianza para la formación de callo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y al aplicar la prueba discriminatoria de medias de Tukey 5% se encontró que este es el octavo tratamiento en orden de importancia para la formación de callo propiamente dicha, como puede verse en el cuadro 6.

Cuadro 6 Respuesta en formación de callo por los 10 tratamientos que respondieron a la inducción de callo y Prueba de tukey al 5% para las medias de los tratamientos.

Tratamiento			Medias de los tratamientos	prueba de tukey 5%
Explante	Auxina mg/L			
	2,4-D	ANA		
Hipocotilo	3	0	0.04113	A
Embrión	1	0	0.03480	AB
Hipocotilo	2	1	0.03405	AB
Hipocotilo	3	2	0.03285	ABC
Embrión	3	0	0.02650	ABCD
Embrión	2	1	0.02250	ABCD
Raíz	2	1	0.01920	BCD
Hipocotilo	3	0	0.01673	BCD
Raíz	3	2	0.01260	CD
Raíz	3	0	0.01098	D

Otra causa por la cual no se consideró el mejor tratamiento a aquel en el que se utilizó 3 mg/l de 2,4-D y el cotiledón fue la pobre calidad del callo formado, principalmente la mala consistencia del callo (aparición corchosa) como lo refleja el valor r_j de 4 calculado mediante la metodología de Friedman, este valor r_j es el más bajo de todos los tratamientos. Otra característica fue la tendencia a formar raíces (rizogénesis) de tal manera que el valor r_j calculado para esta variable mediante la prueba de Friedman tuvo un valor de 25.5, el cual no fue el más alto pero sí de los valores más altos.

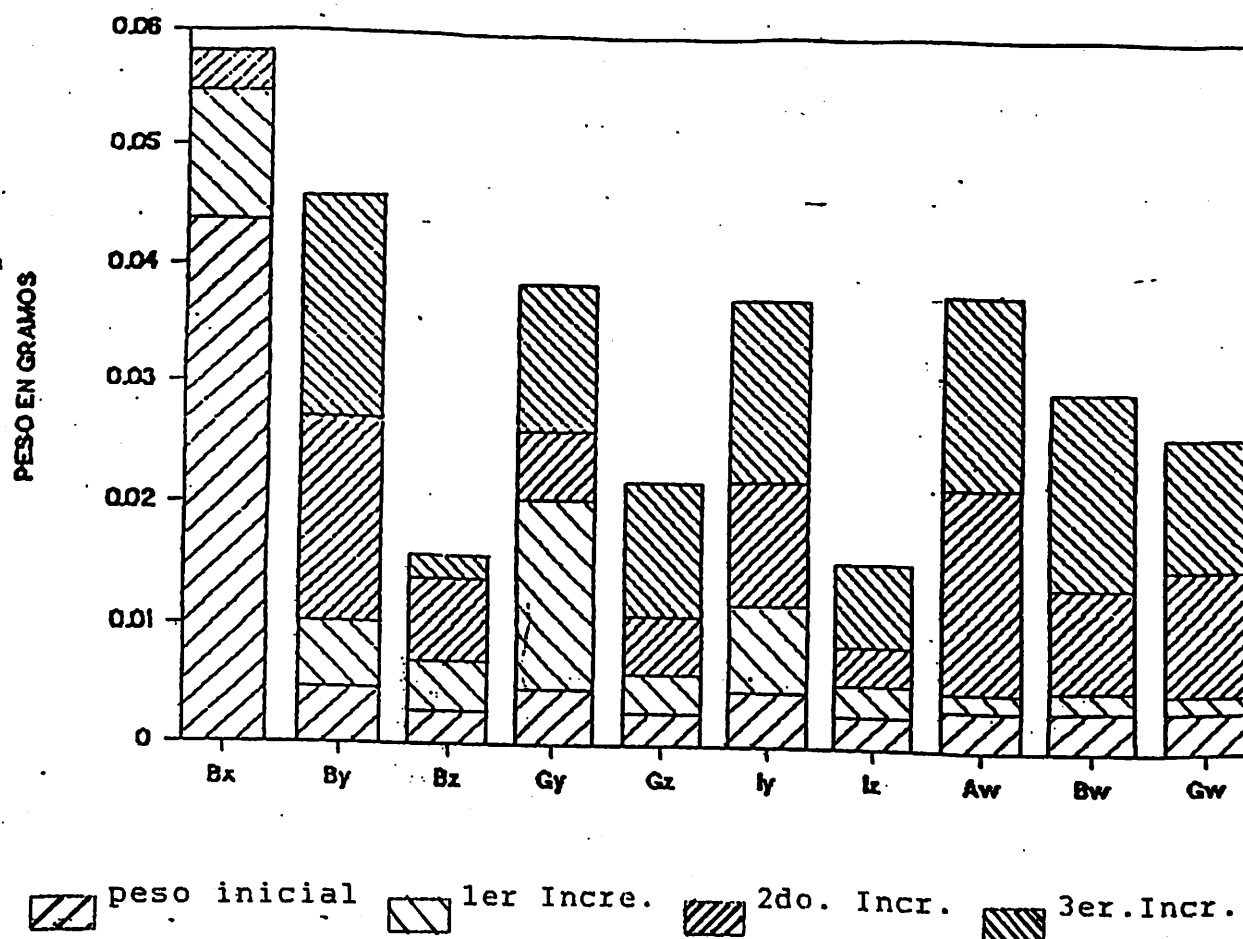


Figura-1 Respuesta e incrementos periódicos de los diferentes explantes de frijol común a la aplicación de diferentes combinaciones de auxinas donde: B = 3 mg/L de 2,4-D; G = 2 mg/L de 2,4-D más 1 mg/L de ANA; I = 3 mg/L de 2,4-D más 2 mg/L de ANA; A = 1 mg/L de 2,4-D; X = Cotiledón; Y = Hipocotilo; W = Embrión y Z = Raíz

El tratamiento en que se utilizó el explante el hipocotilo y se agregó al medio de inducción 3 mg/L de 2,4-D, obtuvo un valor de peso fresco de 0.8526 gramos y el peso seco tuvo un valor de 0.04593 gramos, la media corregida por el análisis de covarianza tuvo un valor de

0.4500. En este tratamiento es necesario hacer las siguientes consideraciones; al aplicar una prueba de Tukey con significancia del 5% a los valores de peso seco del callo producido por los diferentes tratamientos no se encontraron diferencias significativas entre este tratamiento y el primer tratamiento, tal y como se puede observar en el cuadro 5, con la ventaja que los incrementos logrados por este tratamiento fueron considerables durante el período de inducción como se observa en la figura 1; además las características de consistencia y rizogénesis del callo formado con este tratamiento fueron buenas, así el valor r_j calculado para la consistencia mediante la prueba de Friedman tiene un valor de 32 el cual está dentro de los valores más altos logrados por los tratamientos como se observa en el cuadro 7, para la presencia de raíces el valor r_j fue de 15 lo que indica claramente la mínima tendencia de este tratamiento a formar raíces. Tomando en cuenta las características de peso seco, consistencia y rizogénesis de este tratamiento, unido con la tendencia a formar puntos verdes-amarillentos donde potencialmente se podrían formar embriones somáticos, y además al aplicar un análisis de varianza para la formación de callo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y al aplicar una prueba discriminatória de medias de tukey al 5% se encontró que este es el mejor tratamiento en cuanto a formación de callo como puede observarse en el cuadro 6, fue por estas causas que este tratamiento fue seleccionado para establecer la fase de suspensión celular.

Cuadro 7 Valores Rj calculados según la prueba de Friedman para las variables Consistencia y Presencia de raíces.

Tratamiento			Consistencia Rj	Rizogenesis Rj
Explante	Auxina mg/L			
	2,4-D	ANA		
Cotiledón	3	0	4.0	25.5
Hipocotilo	3	0	32.0	15.0
Hipocotilo	2	1	12.0	33.0
Embrión	1	0	16.5	20.5
Hipocotilo	3	2	14.0	28.5
Embrión	3	0	23.0	11.0
Embrión	2	1	16.5	19.5
Raíz	2	1	32.5	30.5
Raíz	3	2	32.5	25.5
Raíz	3	0	37.0	11.0

El tratamiento en el que se utilizó el explante hipocotilo y agregandole al medio de inducción 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de ANA, tuvo un valor para el peso fresco de 0.7108, para el peso seco del callo formado más el explante de 0.03885, y para la media corregida según el análisis de covarianza de 0.38, el cual según la prueba de Tukey (5%) es el tercer tratamiento en orden de importancia. Los incrementos logrados por este tratamiento durante la inducción fueron considerables, la desventaja del callo formado por este tratamiento con el discutido anteriormente radica, en la mala consistencia del callo formado como lo refleja el valor rj de 12 y además tenía tendencia a formar raíces según lo refleja el valor rj de 33 calculado para esta variable, mediante la prueba de Friedman.

Todos los tratamientos en los cuales se utilizó el explante hipocotilo fueron los que más respondieron a la inducción de callo, respuesta que se refleja en los incrementos logrados por todos estos

tratamientos; ésto se debe al estado de crecimiento activo en el cual se obtuvieron los hipocotilos, es en ese estado cuando las auxinas tienen un mayor efecto como lo reporta Weaver (20).

Los tratamientos en los cuales se utilizó como explante el embrión también presentaron incremento en peso seco durante el período de inducción, se observó que cuando este explante fue colocado en un medio que contenía la combinación de 2 mg/L de 2,4-D más 1 mg/L ANA presentó un mínimo crecimiento de la plúmula, lo cual no se observó cuando al medio se le agregó únicamente 2,4-D en concentraciones de 1 y 3 mg/L.

El comportamiento de los tratamientos en los cuales se utilizó el explante raíz presentaron incrementos mínimos en peso seco comparados con los demás tratamientos, comparación que puede hacerse en la figura 1, pero se debe considerar que al momento de la siembra este explante fue el que presentó menor peso seco. Los callos formados a partir de este explante presentaron la mejor consistencia de todos los tratamientos; por ejemplo cuando este explante se colocó en el medio que contenía 3 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de ANA la consistencia del callo producido tuvo un valor de 32.5; mientras que cuando al medio se le agregó 3 mg/L de 2,4-D la consistencia del callo producido por este explante tuvo un valor de 37, valor que es el mayor de todos los tratamientos. La buena consistencia de los callos formados cuando se utiliza como explante la raíz ya fue reportada por Liao y Boll (9) aunque esta consistencia buena se consideró excesiva porque el callo era fácilmente disgregable pero muy susceptible a morirse por desecación. La poca respuesta de la raíz a la formación de callo

medida en peso seco, parece explicarse en la habilidad de los compuestos auxínicos para formar primordios de raíz pero no estimular la división en células de raíz.

En los diez tratamientos que formaron callo y los cuales se presentan en el cuadro 4 es importante decir que el 2,4-D en concentración de 3 mg/L indujo callo en los cuatro explantes utilizados, pero la consistencia y la ausencia de raíces varió con cada explante; en concentración de 1 mg/L indujo callo únicamente con el embrión con características intermedias de consistencia y ausencia de raíces. El 2,4-D combinado con ANA en concentraciones de 2 mg/L y 1 mg/L respectivamente indujo formación de callo con los explantes hipocotilo, embrión y raíz; mientras la combinación 3 mg/L y 2 mg/L respectivamente indujo callo en los explantes hipocotilo y raíz.

8.2 Suspensión celular

El análisis de covarianza encontró efecto de la cantidad inicial de células colocadas en los tratamientos sobre la cantidad final, por lo que fue necesario realizar ajustes a las medias de los tratamientos y posteriormente se les aplicó una prueba discriminatória de medias de tukey (5%), esta prueba no encontró diferencias entre los tratamientos, por lo que los cuatro tratamientos se consideran estadísticamente iguales, como se puede observar en el cuadro 8.

Cuadro 8 Multiplicación celular en los 4 tratamientos evaluados en la suspensión celular.

Tratamiento Auxinas 0.1 mg/L	Células/ml medias			Tukey(5%)
	Inicial	Final	Corregida	
ninguna	32729	101659	108014	A
2,4-D	22929	74543	90879	A
ANA	46782	82163	74207	A
AIA	53439	123797	109062	A

La igualdad estadística de los tratamientos tiene importancia porque se puede establecer un cultivo de células de frijol sin utilizar reguladores del crecimiento, incluso el no aplicar regulador del crecimiento supera en proliferación celular a los tratamientos en los cuales se utilizan reguladores con características fuertes de auxina como el 2,4-D y el ANA, siendo superado únicamente por el tratamiento en el que se aplica la auxina natural AIA, se debe considerar que este compuesto es poco estable en la luz como lo reporta Weaver (20) y por lo tanto es muy posible que dicho producto se haya desintegrado rápidamente.

Para comprender lo que sucedió en las suspensiones celulares hay que partir de un hecho conocido, como lo es el comportamiento de las suspensiones celulares en fases bien definidas, tal y como lo ha reportado Hurtado y Merino (8). Partiendo del comportamiento del tratamiento testigo sin reguladores del crecimiento en el cual se supone que las células crecieron en forma natural y que por lo tanto las fases son reconocibles se pretende describir las fases; en el día 2 al día 7 se tuvo poco incremento en el número de células por

mililitro, aquí se consideró que las células estaban en fase de adaptación a las condiciones del medio; luego del día 7 al 17 el incremento fue considerable y se dice que las suspensiones entraron a las fases exponencial y lineal, porque luego de la adaptación sigue una fase de división celular continua y muy activa, provocando que en pocos días la cantidad de células crezca en forma exponencial; luego se observa la fase lineal, porque el número de células crece proporcionalmente al tiempo transcurrido; en el período transcurrido del día 17 al 22 el número de células ya no se incrementó considerablemente y se dice que la suspensión entro en fase estacionaria, fase en la cual la división celular se reduce provocado por agotamiento del algún nutriente en el medio o la acumulación de algún desecho celular que en cantidades altas se vuelve tóxico o lo que se considera más probable la ocurrencia de las dos causas, para tener una mejor idea se puede observar la figura 2 en donde se observa el comportamiento de los tratamientos.

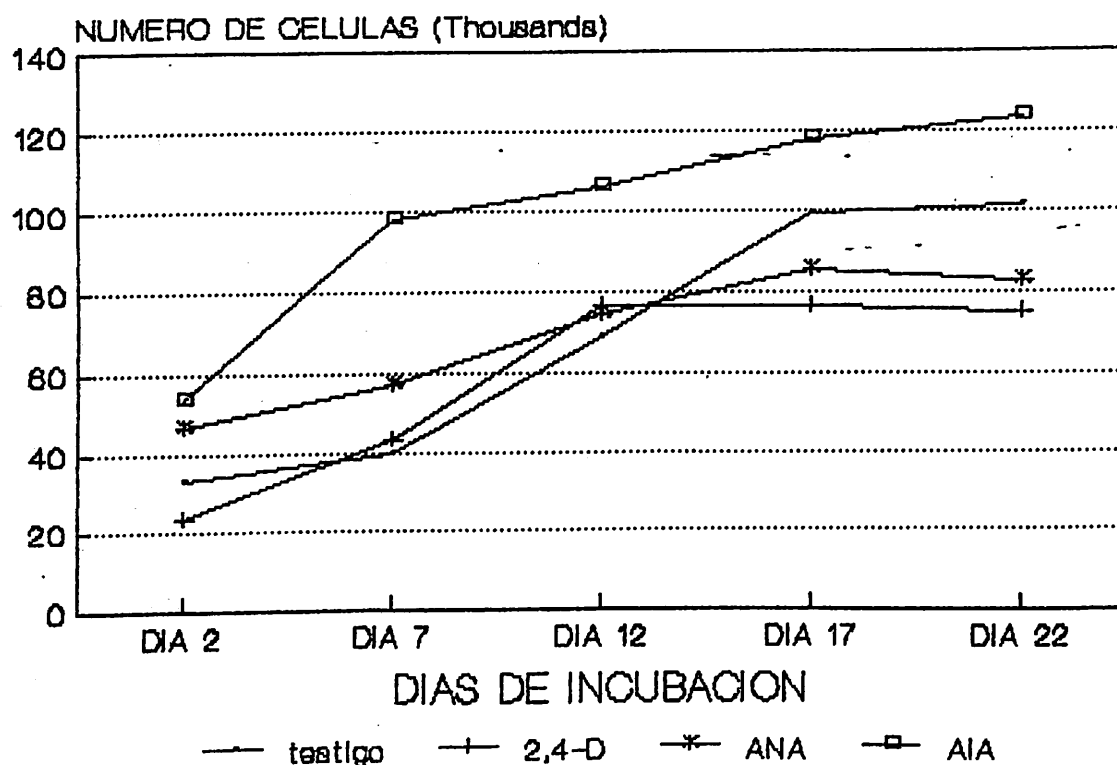


Figura 2 Efecto de las auxinas sobre la multiplicación celular, en cultivos celulares in vitro de frijol común variedad Parramos.

Como se conoce la curva teórica del crecimiento de una suspensión celular es necesario discutir cómo afectan los reguladores del crecimiento del tipo auxina en una suspensión celular. La fase de reposo se alteró porque se inició tempranamente la división celular, en otras palabras las auxinas reducen el tiempo de adaptación de las células al medio de cultivo, esto se debe a que las auxinas son estimuladoras del crecimiento celular (división y aumento de volumen), parece que la auxina natural AIA es la más efectiva en estimular la temprana división celular, porque de los cuatro tratamiento es la AIA

la que presentó un mayor incremento en la fase de reposo (del día 2 al 7) como se puede observar en la figura 2; el 2,4-D también es efectivo en reducir la fase de reposo, como lo refleja el aumento en el número de células logrado por este tratamiento entre el día 2 al 7.

En relación a la fase estacionaria y el momento en que los tratamientos llegaron a ésta, se debe decir que el primer tratamiento en el que se observó la misma fue el que contenía 2,4-D y se manifestó en el día 12, mucho más temprano que en los demás tratamientos; este tratamiento tuvo como característica crecer con rapidez en la primeras fases comprendidas del día 2 al 12, esta alta actividad celular pudo haber provocado acumulación de algún producto tóxico o agotamiento de algún nutriente en el medio, aunque esto ultimo es menos probable. El segundo tratamiento en llegar a la fase estacionaria fue el que contenía ANA y lo hizo a partir del día 17, el estacionamiento de la actividad celular pudo deberse a causas similares al tratamiento con 2,4-D, aunque tiene como característica crecimientos homogéneos en a lo largo de todo el período de cultivo, del día 2 al 17 su comportamiento gráfico fue casi una línea recta como puede verse en la figura 2. Mientras el tratamiento con AIA no llegó a la fase estacionaria en el período de muestreo, pero el último incremento que se dio del día 17 al 22 fue mínimo, fenómeno que también se dio en el testigo, por lo que se hizo necesario, a partir del día 22, transferir a un medio nuevo (subcultivar); este fenómeno refuerza la idea de la presencia del algún metabolito tóxico en los tratamientos con 2,4-D y ANA, porque si el estacionamiento de la división celular se hubiera debido al agotamiento de algún nutriente esto debió suceder casi al mismo tiempo para los

cuatro tratamientos; además no hay que olvidar que el AIA es natural en los tejidos vegetales y que en zonas de alta división celular existe síntesis de AIA como lo reporta Weaver (20), por lo que es muy probable que en el tratamiento testigo haya existido presencia de AIA.

En todos los cultivos de células establecidos fue posible observar una gran diversidad en la forma de células, lo cual puede ser un indicio de lo mutagénico que resulta la aplicación de auxinas a los medios utilizando esta técnica, tal como lo ha reportado Eferson (5), esto puede deberse a la alta cantidad de divisiones celulares en forma continua lo que sin duda alguna aumenta la probabilidad de que se de una mutación, la cual puede llegar hasta la alteración del número cromosómico completo fenómeno conocido como poliploidia. Otra característica de los cultivos de células es la facilidad para hacer observaciones de células aisladas y así estudiar la división celular, sin olvidar que el cultivo de células es una fase previa para el cultivo de protoplastos y luego la hibridación somática.

En los cultivos celulares se formaron agregados celulares que se esperaba pudieran formar tejido organizado bien sea órganos o la planta completa. Los cultivos de células a los cuales no se les había agregado regulador del crecimiento, fue en donde se formaron agregados celulares con tonalidades verdes, aunque en los demás cultivos también se encontraron, sin embargo en el cultivo tratado con AIA fue en donde se encontró tejido organizado pues algunos agregados celulares formaron hojas y otras raíces, pero nunca se formó la planta completa en un agregado; esta organización del tejido puede deberse a que el AIA tiene características débiles de auxina y ésto favoreció la organización del

agregado.

Los agregados celulares formados por los cultivos celulares fueron llevados a medios de regeneración conteniendo bencil adenina y caseína hidrolizada compuestos que tienen importancia en la regeneración de plantas como lo reporta Crocomo y colaboradores (3); los agregados en los medios de regeneración no respondieron como se esperaba es decir que formaran plantas o bien órganos. La poca respuesta obtenida en la regeneración de plantas de frijol es normal como lo han reportado algunos investigadores por ejemplo Tulman Neto, (16) opina "Sabemos que el trabajo de cultivo de tejidos en frijol es un trabajo difícil" y Ochoa (11) quien opina " el frijol es una planta difícil de trabajar en cultivo de tejidos y deberá dedicarse mucho tiempo, esfuerzo y paciencia para conseguir la regeneración, es muy importante probar diferentes variedades y diferentes tipos de tejido en combinación con reguladores del crecimiento y las condiciones ambientales".

9 CONCLUSIONES

- 1 La combinación de auxinas que más favorece la inducción de callo en explante de frijol común variedad Parramos es aquella en la que se utiliza únicamente el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 1 y 3 mg/L. El 2,4-D combinado con ácido naftalenácético en las siguientes concentraciones 1 mg/L más 2 mg/L respectivamente y 2 mg/L más 3 mg/L respectivamente, también favorece la inducción de callo.

- 2 Para la variedad de frijol Parramos el explante que más responde a la inducción de callo utilizando auxinas es el hipocotilo, principalmente por la alta división celular que presenta al momento de la siembra; el embrión también produce una buena cantidad de callo de buena consistencia y sin raíces; por el contrario la raíz produce poca cantidad de callo, pero con muy buena consistencia y por último el cotiledón tiene poca respuesta a la inducción de callo.

- 3 En la suspensión celular no existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, aunque la auxina que más favorece la multiplicación celular es el ácido indolacético (AIA) con la ventaja que los cultivos tratados con esta auxina forman una cantidad considerable de agregados celulares con tendencia a organizarse, como también sucedió en el tratamiento sin regulador del crecimiento.

- 4 El uso de auxinas reduce la fase de adaptación en los cultivos de células, principalmente por su efecto inductor de la actividad celular, las auxinas más efectivas en reducir la adaptación de las células al medio son en su orden AIA, 2,4-D y ANA. Pero el 2,4-D y el ANA presentan la desventaja de detener tempranamente la proliferación celular.

10 RECOMENDACIONES

1. Evaluar concentraciones de 2,4-D desde 1 hasta 3 mg/L, utilizando el explaante hipocotilo. Para encontrar la concentración más baja a la cual exista buena formación de callo, para evitar utilizar concentraciones muy altas que tendran efectos negativos en la regeneración de plantas.
2. Investigar en la regeneración de plantas, partiendo de callos o agregados celulares, para hacer un aporte significativo en la aplicación de cultivo de tejidos a los programas de mejora genética de frijol común.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILAR, M.E. 1988. Cultivo de tejidos en café, cacao y plátano. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza. 60 p.
2. ARIAS, O.; CROCOMO, O. 1979. Influencia de la arginina en la diferenciación de raíces en tejidos de frijol (Phaseolus vulgaris) cultivadas in vitro. Agronomía (C.R.) 3(2):193-195.
3. CROCOMO, O.; PETERS, J.E.; SHARP, W.R. 1975. A literatura review and the requeriments for growth of (Phaseolus vulgaris) in tissue culture. Arquitectura Biología Tecnología (Bra.) 20:25-31.
4. DODDS, J.; ROBERTS, L. 1985. Experiments in plant tissue culture. New York, EE.UU., Cambridge University Press. 224 p.
5. EFFERSON, N.J. 1987. Biotecnología la nueva revolución verde. Agricultura de las Américas (EE.UU.) 3(36): 20-25.
6. EVANS, D. et al. 1983. Handbook of plant cell culture; techniques for propagation and breeding. New York, EE.UU., Macmillan Publishing. 770 p.
7. GOMEZ BRENES, R. 1970. Importancia del frijol en América Latina y variabilidad en su composición química. In Reunión anual para el mejoramiento de los cultivos alimenticios (16., 1970, Antigua Guatemala, Gua). Guatemala, IICA. p. 9-14.
8. HURTADO, S.M.; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Mexico, Trillas. 227 p.
9. LIAU, D.F.; BOLL, W.G. 1970. Callus and cell suspensión culture of bush bean (Phaseolus vulgaris) cv. contender. J. Plant Botánica (Can.) 48:1119-1130.

10. MARTINS, I.S.; SONSDAHL, M.R. 1984. Early stages of somatic embryo differentiation from callus cells of bean (Phaseolus vulgaris) grown in liquid medium. J. plant Physiol. (EE UU.) 117:97-103.
11. OCHOA ALEJO, N. 1990. Suspensiones celulares y regeneración de plantas de frijol. México, Instituto Politécnico Nacional. (Correspondencia personal).
12. PETERS, J.E.; CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. 1976. Efect of caffeine and nicotine on the callus growth and root morphogenesis of (Phaseolus vulgaris) tissue cultures Turrialba (C.R.) 26(4):337-341.
13. SIRIWARDANA, S. 1987. Plant tissue culture methods international plant. Colorado, EE UU., Colorado State University. 62 p.
14. THORPE, T.A. 1981. Plant Tissue culture, methods and applications in agriculture. New York, EE UU., Academic Press. 300 p.
15. TONIN, G.S. et al. 1981. Aminoacids in the callus growth and root morphogenesis of bean (Phaseolus vulgaris) leaves cultured in vitro. Turrialba (C.R.) 31(3):245-252.
16. TULMAN NETO, A. 1990. Cultivo de tejidos frijol. Brasil. Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Correspondencia personal).
17. VASQUEZ NARVAEZ, J. 1983. Cultivo de tejidos en arroz (Oryza sativa L.) inducción de callo y regeneración de plantas. Arroz (Col.) 32:26-30.
18. VILLALOBOS, V.M. 1986. Fundamentos teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de Posgraduados, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. 192 p.
19. ----- 1988. Fundamentos teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 211 p.

20. WEAVER, R J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. por Agustín Contin. México, D.F., Trillas. 622 p.

Vo. Bo.

Petrucci



12 APENDICES

Apendice 1 Componentes del medio de cultivo de Murashige
y Soog (MS)

INGREDIENTES	mg/L
(NH ₄ ,NO ₃	1650.00
KNO ₃	1900.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA	33.60
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	- 0.025
Mioinositol	100.00
Acido Nicotinico	0.50
Piridoxina-HCl	0.50
Tiamina-HCl	0.10
Glicina	2.00
Sucrosa	3% p/v
Agar	0.7% p/v

Apendice 2 información Primaria generada en la fase de inducción de callo

Cuadro 8A Peso seco de los tratamientos en el día 2 posterior a la siembra.

Tratamiento			Repeticiones			
Explante	auxina mg/L		I	II	III	IV
	2,4-D	ANA				
Cotiledón	3	0	0.0502	0.0399	0.0451	0.0303
Hipocotilo	3	0	0.0057	0.0044	0.0052	0.0039
Raíz	3	0	0.0017	0.0067	0.0017	0.0012
Hipocotilo	2	1	0.0057	0.0044	0.0052	0.0039
Raíz	2	1	0.0067	0.0017	0.0017	0.0012
Hipocotilo	3	2	0.0044	0.0052	0.0057	0.0039
Raíz	3	2	0.0017	0.0017	0.0012	0.0067
Embrión	1	0	0.0034	0.0034	0.0036	0.0038
Embrión	3	0	0.0036	0.0034	0.0038	0.0034
Embrión	2	1	0.0038	0.0036	0.0034	0.0035

Cuadro 9A Peso seco de los tratamientos en el día 15 posterior a la siembra.

Tratamiento			Repeticiones			
Explante	Auxina mg/L		I	II	III	IV
	2,4-D	ANA				
Cotiledón	3	0	0.0540	0.0480	0.0718	0.0586
Hipocotilo	3	0	0.0422	0.0515	0.0460	0.0440
Raíz	3	0	0.0100	0.0138	0.0152	0.0162
Hipocotilo	2	1	0.0518	0.0355	0.0251	0.0430
Raíz	2	1	0.0141	0.0280	0.0300	0.0160
Hipocotilo	3	2	0.0360	0.0333	0.0450	0.0363
Raíz	3	2	0.0181	0.0107	0.0200	0.0129
Embrión	1	0	0.0496	0.0450	0.0278	0.0310
Embrión	3	0	0.0380	0.0208	0.0275	0.0339
Embrión	2	1	0.0298	0.0186	0.0272	0.0287

Apendice 3 Información básica generada en la fase de suspensión celular

Cuadro 10A número de células de los tratamientos en el días 2 después de la transferencia.

Tratamiento Auxina 0.1 mg/L	Repeticiones			
	I	II	III	IV
ninguna	22929	26627	39941	41420
2,4-D	15533	30325	29586	16272
ANA	34763	55473	23669	73225
AIA	64349	30325	88757	30325

Cuadro 11A número de células de los tratamientos en el día 22 posterior a la transferencia.

Tratamiento Auxina 0.1 mg/L	Repeticiones			
	I	II	III	IV
ninguna	140449	76501	103550	86136
2,4-D	75443	60568	101220	60941
ANA	58431	66568	72485	131171
AIA	134431	64510	175321	120929

Apendice 5 Resumen de los análisis estadísticos

Cuadro 12A Resumen del Análisis de Covarianza efectuado entre el peso seco del explante al momento de la siembra y el peso seco del callo formado más el explante utilizado

F. V.	G.L	S.C	C.M	F. C.
Bloques	3	0.00009	0.000032	
Tratamientos	9	0.0039	0.000043	7.12
Error	26	0.0016	0.00006	
Covariable	1	0.000012	0.000012	0.21
Total	39	0.0086		

Cuadro 13A. Resumen del Análisis de Varianza aplicado a la formación de callo.

F. V.	G.L	S.C	C.M	F. C.
Bloques	3	0.000056	0.000018	
Tratamientos	9	0.003841	0.000042	4.18
Error	27	0.001958	0.000072	
total	39	0.005856		

Cuadro 14A Resumen del análisis de Covarianza aplicado a los cultivos celulares, para encontrar efecto del número inicial de células sobre el número final.

F. V.	G.L	S.C	C.M	F. C.
Bloques	3	3516650414	1172516804	
Tratamientos	3	3216650414	1086462731	2.10
Error	8	4135854680	516981835	
Covariable	1	4193349994	4193349994	8.11
Total	15	0.0086		



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

Ref. Sem. 021-92

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DEL FRIJOL COMUN (Phaseolus vulgaris) cv.
A LA INDUCCION DE CALLO Y AL CULTIVO DE CELULAS EN
SUSPENSION".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: HECTOR RONALDO RAMAZZINI SANTOS

CARNET No. 8614794

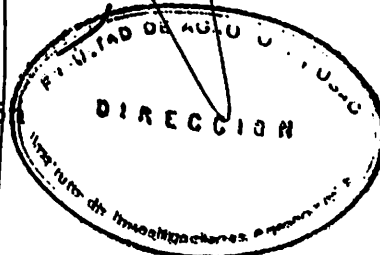
HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. José Jesús Chonay y
Dr. Luis Mejía.

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que
ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agro-
nomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Edgar Franco
A S E S O R

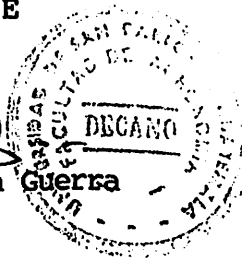
Ing. Agr. Domingo Amador
A S E S O R

Dr. Luis Mejía de León
DIRECTOR DEL IIA



I M P R I M A S E

Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
D E C A N O



c.c. Exp. Estudiante
Control Académico
Archivo.