

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

EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN
FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) VARIEDAD QUINACK CHE

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



JUAN ALVARADO GOMEZ

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, marzo de 1,992

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

DL
01
T (1347)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

RECTOR

DR. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACUTAD DE AGRONOMIA

DECANO:	Ing. Agr. Efraín Medina G.
VOCAL I:	Ing. Agr. Mynor Estrada R.
VOCAL II:	
VOCAL III:	
VOCAL IV:	P. Agr. Elías Raymundo R.
VOCAL V:	P. Agr. Francisco Ibarra C.
SECRETARIO:	Ing. Agr. Marco Romilio Estrada M.



Guatemala, 3 de marzo de 1,992

Señores

Honorable Junta Directiva

Honorable Tribunal Examinador

Facultad de Agronomía

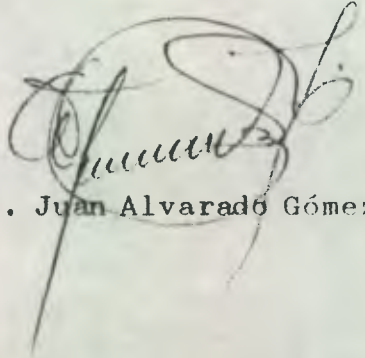
Universidad de San Carlos de Guatemala

De conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de Tesis titulado:

"EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.) VARIEDAD QUINACK CHE"

Presentándolo como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas, espero merezca vuestra aprobación.

Respetuosamente.


P. Agr. Juan Alvarado Gómez

1917

1917

1917

1917

1917

The company had one day in the month of the year 1917. In the month of the year 1917, the company had one day in the month of the year 1917. In the month of the year 1917, the company had one day in the month of the year 1917.

1917

1917

1917

1917

1917

1917

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS Ser Todopoderoso que me permite vivir para lograr mis objetivos e ideales.
- A MIS PADRES: Lucas Alvarado L. y
Arcadia Gómez de Alvarado
Por su ejemplo de trabajo.
- A MIS SUEGROS: Matías Jerónimo G. (QEPD) y
María de Jesús Marroquín de J.
Por sus sabios consejos y ejemplo de sacrificios para alcanzar las metas en la vida
- A MI ESPOSA: Ana Lisette
Por todo su amor, comprensión y apoyo en la realización de mi carrera universitaria.
- A MIS HIJOS: Juan Angel y Juan David
Especialmente para ellos, con todo mi amor.
- A MIS HERMANOS: Con cariño fraternal.
- A: José Ríos Navas, Familia Valladares Ríos y
Mario Cifuentes Ovalle.
Por su apoyo en el inicio de mi carrera universitaria.

Page 2 of 3

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

TESIS QUE DEDICO

A:

GUATEMALA

EL CASERIO PATIXLAN

LA ALDEA XOCOC

RABINAL, BAJA VERAPAZ

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

LA FACULTAD DE AGRONOMIA

EL INSTITUTO TECNICO DE AGRICULTURA

EL INSTITUTO DE EDUCACION BASICA DE RABINAL

LOS IMPULSORES DEL CULTIVO IN VITRO DE

ESPECIES VEGETALES EN GUATEMALA

A MIS AMIGOS, EN ESPECIAL A:

Hans Dorst Kraus

Danilo Guzmán Sánchez

Henry Flores

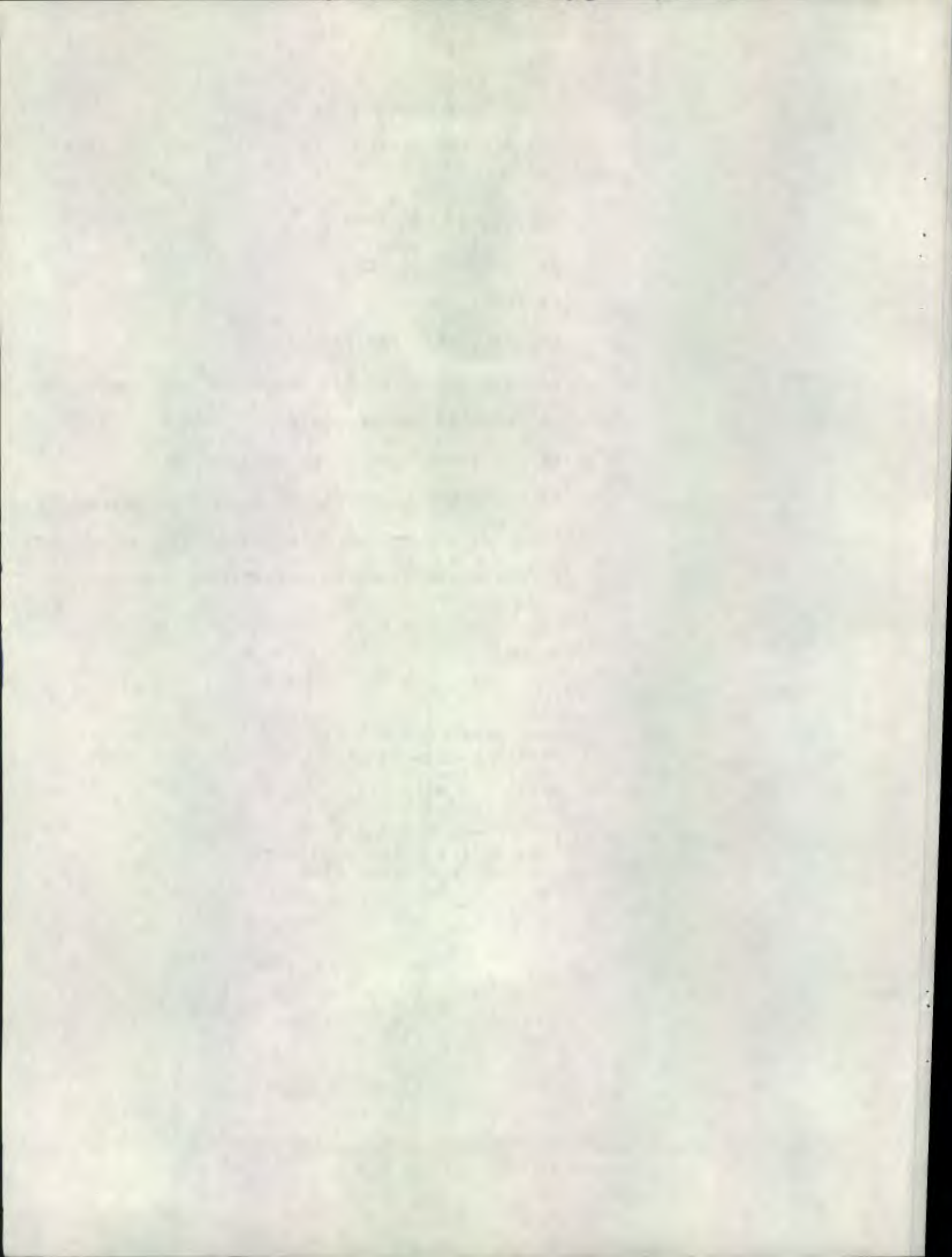
Wellinton Palencia

Conchita Prera

Ing. Fredy Hernández Ola

Ing. Felipe Jerónimo Manuel

Ing. Félix Alberto Díaz



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a mis asesores Ings. Agrs. Edgar O. Franco R. y Domingo Amador Pérez. Por su valiosa orientación en el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A Ismael García Urizar, Héctor Ramazzini e Ing. José H. Calderón por su desinteresada colaboración al inicio de este trabajo.

Al Dr. Joe Tohme, de la Unidad de Investigación de Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Colombia. Por su valiosa donación de material bibliográfico.

A Matías Jerónimo González (QEPD), por su hospitalidad, comprensión, apoyo económico y moral en una de las fases más difíciles de vida.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta Tesis.



CONTENIDO GENERAL

	Página
CONTENIDO	vii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE CUADROS	xi
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 La biotecnología, antecedentes, desarrollo y perspectivas	4
3.2 Desarrollo del embrión, raíz e hipocotilo	4
3.3 Inoculación e iniciación del callo	7
3.4 Cambios en el cultivo del callo	8
3.5 Morfología y citología del callo	8
3.6 Medios de cultivo	9
3.6.1 Sales inorgánicas	9
3.6.2 Reguladores del crecimiento	9
3.6.3 Nitrógeno orgánico	10
3.6.4 Vitaminas	10
3.6.5 Materiales inertes o de soporte	10
3.7 Algunas investigaciones realizadas sobre el cultivo de tejidos en frijol	11
4. OBJETIVOS	22
5. HIPOTESIS	22
6. MATERIALES Y METODOS	23
6.1 Material vegetal	23
6.2 Fases del estudio	24
6.2.1 Fase de inducción de callo	24

1917

1917

6.2.1.A	Medios de cultivo	24
6.2.1.B	Tipos de explantes	25
6.2.1.C	Diseño experimental	25
6.2.1.D	Unidad experimental	26
6.2.1.E	Modelo estadístico	26
6.2.1.F	Distribución de los tratamientos	26
6.2.1.G	Manejo del experimento	29
6.2.1.G.a	Preparación del medio	29
6.2.1.G.b	Obtención preparación e inoculación de los explantes	29
6.2.1.G.c	Condiciones de cultivo	30
6.2.1.G.d	VARIABLES EVALUADAS	30
6.2.1.G.e	Método de análisis	30
6.2.2	Fase de regeneración de plantas	32
6.2.2.A	Evaluación de medios de regeneración	32
6.2.2.B	Medios de cultivo para la regeneración	33
6.2.2.C	Callo producidos en la primera fase	34
6.2.2.D	Diseño experimental	34
6.2.2.E	Unidad experimental	35
6.2.2.F	Modelo estadístico	35
6.2.2.G	Distribución de los tratamientos	35
6.2.2.H	Manejo del experimento	38
6.2.2.I	Método de análisis	39
6.2.2.J	Subcultivos	39
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	41
7.1	Resultados de la inducción de callo en los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog	41
7.1.1	Inducción de callo	41
7.1.2	Peso fresco	45

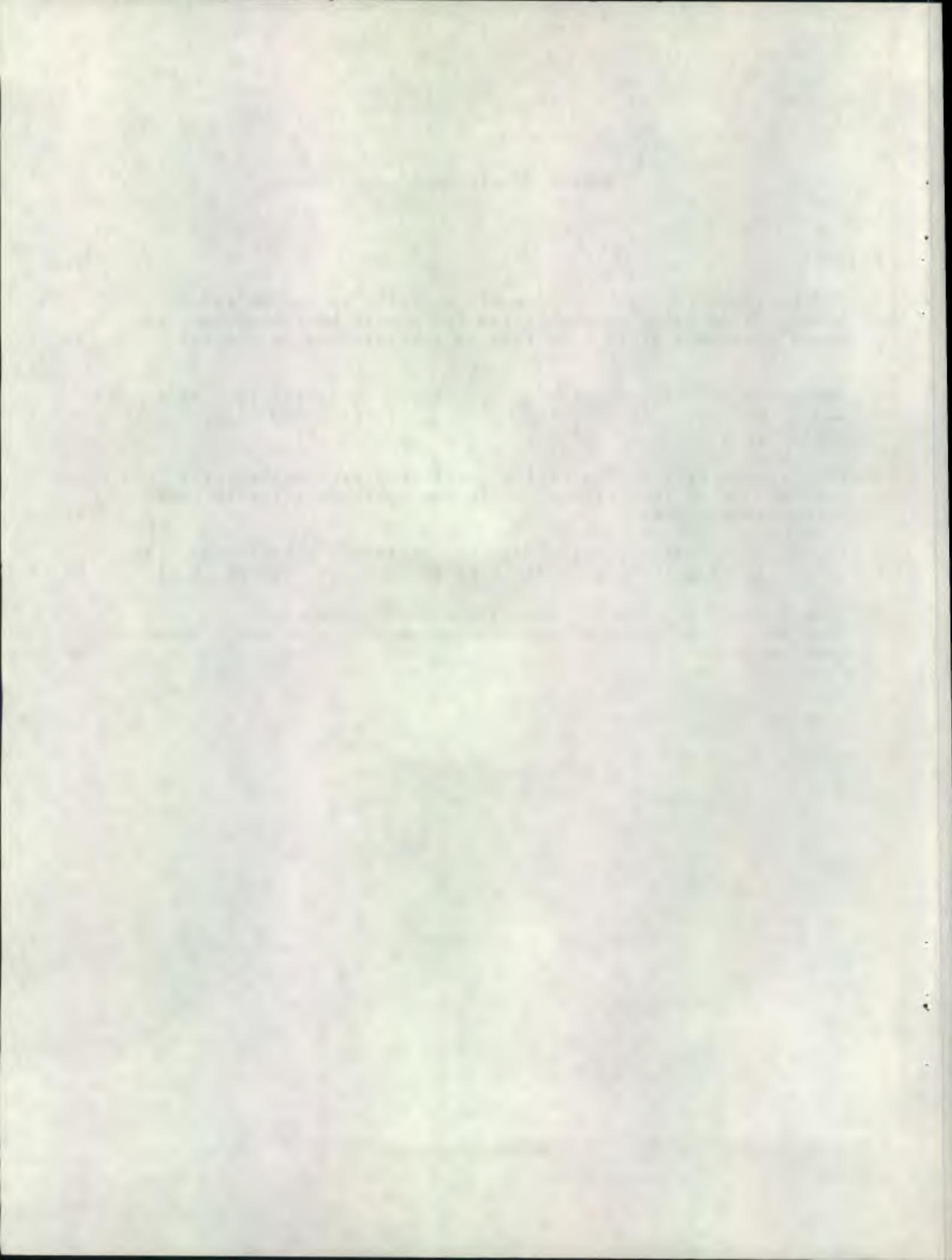
RECEIVED BY THE DIRECTOR OF THE BUREAU OF LAND MANAGEMENT
U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR

7.1.3	Consistencia de los callos	48
7.2	Resultados de la inducción de callo en los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al</u>	50
7.2.1	Inducción de callo	50
7.2.2	Peso fresco	54
7.2.4	Consistencia de los callos	57
7.3	Inducción de la regeneración de plantas	58
7.3.1	Callos originados en el primer grupo de medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog	58
7.3.2	Callos originados en el segundo grupo de medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al</u> .	59
8.	CONCLUSIONES	61
9.	RECOMENDACIONES	62
10.	BIBLIOGRAFIA	63
11.	APENDICE	66



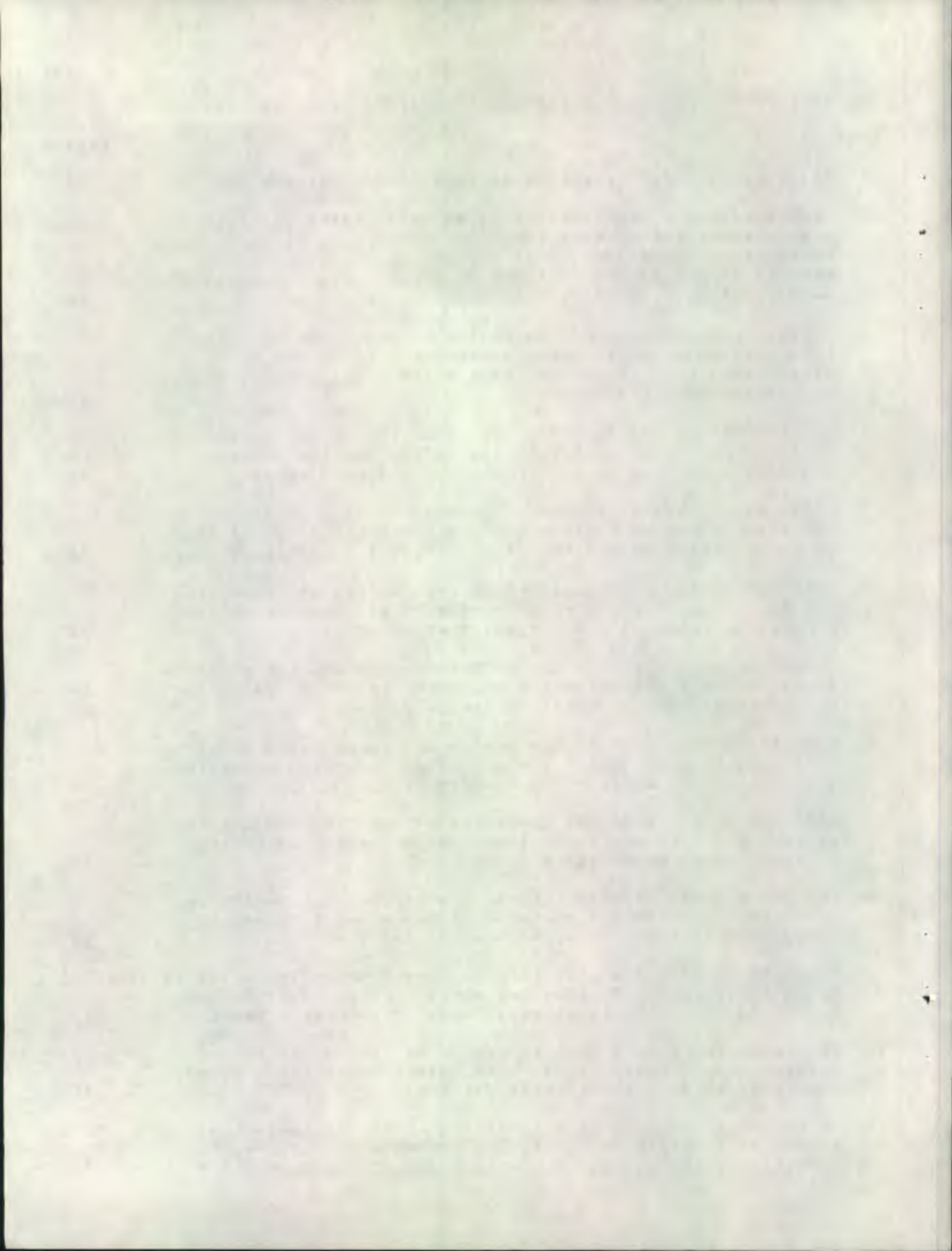
INDICE DE FIGURAS

Figura:	Página
1 Secuencia de la fase de inducción de callo en los medios de inducción de callo que contenían los medios basales Murashige-Skoog y Gamborg <u>et al</u> y la fase de regeneración de plantas	40
2 Inducción de callo, empleando tres tipos de explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog	44
3 Peso fresco (gr) de los callos, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog	47
4 Inducción de callos, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al</u> .	53
5 Peso fresco (gr) de los callos, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al</u> .	56



INDICE DE CUADROS

Cuadro:	Página
1 Principales características de la variedad Quinack Che	23
2 Combinaciones y concentraciones de ácido naftalenacético y N ⁶ furfuril aminopurina (ANA/KIN) utilizando el medio basal Murashige y Skoog (MS). Y de 2,4-diclorofenoxiacético y N ⁶ furfurilaminopurina (2,4-D/KIN) usando el medio basal Gamborg <u>et al.</u>	25
3 Arreglo combinatorio de los medios de inducción de callo (ANA/KIN) en el medio basal Murashige y Skoog y 2,4-diclorofenoxiacético y KIN en el medio basal Gamborg <u>et al.</u> , en ensayos independientes	27
4 Aleatorización de los medios de inducción de callo (ANA/KIN) y tipos de explantes en los medios basales Murashige-Skoog y Gamborg <u>et al.</u> , en ensayos independientes	28
5 Medio basal Murashige-Skoog, combinación de reguladores del crecimiento que se evaluaron en la regeneración de plantas, de callos originados sobre el medio basal Murashige y Skoog	33
6 Medios basales, combinaciones de reguladores del crecimiento que se evaluaron en la regeneración de plantas, de callos producidos sobre el medio basal Gamborg <u>et al.</u>	34
7 Arreglo combinatorio de los medios de regeneración y callos derivados de 3 explantes y 6 medios de inducción de callo, que contenía el medio basal Murashige y Skoog	36
8 Arreglo combinatorio de los medios de regeneración y callos derivados de 3 explantes y 6 medios de inducción de callo, que contenía el medio basal Gamborg <u>et al.</u>	38
9 Análisis de varianza del número de callos, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog	41
10 Prueba de Tukey para la interacción explantes x medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog, con un nivel de significancia del 5 %	42
11 Análisis de varianza para el peso fresco de callos a los 15 días de cultivo, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog.	46
12 Prueba de Tukey para el peso fresco de los callos en los tratamientos sobre el medio basal Murashige y Skoog, con un nivel de significancia del 5 %	46
13 Prueba de Tukey para el peso fresco en los tratamientos medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog, con un nivel de significancia del 5 %	46



14	Análisis de varianza del número de callos a los 15 días de cultivo, empleando 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al.</u>	50
15	Prueba de Tukey para la interacción explantes x medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al.</u> , con un nivel de significancia del 5 %.	51
16	Análisis de varianza para el peso fresco de los callos, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg <u>et al.</u>	55
17	Prueba de Tukey para la interacción explantes x medios de inducción de callo que contenía el medio basal basal Gamborg <u>et al.</u> , con un nivel de significancia del 5 %	55
18	"A" Composición química de los medios basales utilizados en la inducción de callo y regeneración de plantas en frijol (en mg/l)	67
19	"A" Número de callos inducidos sobre el medio basal Murashige y Skoog, a los 15 días de cultivo	67
20	"A" Peso fresco de los callos inducidos sobre el medio basal Murashige y Skoog, a los 15 días de cultivo	68
21	"A" Consistencia de los callos inducidos sobre el medio basal Murashige y Skoog, a los 15 días de cultivo	68
22	"A" Número de callos inducidos sobre el medio basal Gamborg <u>et al.</u> , a los 15 días de cultivo	69
23	"A" Peso fresco de los callos inducidos sobre el medio basal Gamborg <u>et al.</u> , a los 15 días de cultivo	69
24	"A" Consistencia de los callos inducidos sobre el medio basal Gamborg <u>et al.</u> , a los 15 días de cultivo	69
25	"A" Inducción de la regeneración de plantas en callos de embrión, originados sobre el medio basal Murashige y Skoog	70
26	"A" Inducción de la regeneración de plantas en callos de raíz, originados sobre el medio basal Murashige y Skoog	70
27	"A" Inducción de la regeneración de plantas en callos de hipocotilo, originados sobre el medio basal Murashige y Skoog	70



Evaluación de medios de cultivo para
la inducción de callo y regeneración de plantas en
frijol (Phaseolus vulgaris L.), variedad Quinack Che.

Culture media evaluation for callus induction and plant
regeneration in common bean (Phaseolus vulgaris L.) cv. Quinack Che.

RESUMEN

En este documento se presenta la evaluación de diferentes medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración plantas en frijol (Phaseolus vulgaris L.) variedad Quinack Che; el comportamiento de los explantes de embrión, raíz e hipocotilo a la inducción de callo y la respuesta de los callos en la regeneración de plantas. Los medios de inducción de callo empleados en la investigación estuvieron constituidos por los medios basales Murashige Skoog (MS) suplementado con seis combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y N⁶furfuril aminopurina (KIN) y el medio basal Gamborg et al (B5) más seis combinaciones de los reguladores del crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y N⁶furfuril aminopurina (KIN). Los explantes de embrión se extrajeron a partir de granos de frijol remojados durante 24 horas, mientras que los tejidos de raíz e hipocotilo se obtuvieron de plántulas de tres días en proceso de germinación.

Los callos obtenidos en los dos medios basales MS y B5 fueron evaluados cada cual en cinco diferentes medios de regeneración. Luego los callos que presentaron centros de regeneración se transfirieron a medios constituidos por el medio basal MS más siete combinaciones de ANA y bencil aminopurina (BAP). Por último se transfirieron sólo los puntos

verdes en el medio basal MS sin reguladores de crecimiento.

El efecto de la inducción de callo en el medio basal MS, indica que el mayor rendimiento de callos se alcanzó con el medio de inducción de callo suplementado con 5.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN, utilizando al hipocotilo como explante. El mayor peso fresco se obtuvo de callos a partir de explantes de embrión en el medio que contenía 5.0 mg/l de ANA y 3.0 mg/l de KIN. El 99 % de los callos producidos en el medio basal MS fueron de consistencia compacta.

En el medio basal B5, la mayor respuesta en la inducción de callos se observó en explantes de raíz en concentraciones de 0.1 mg/l y 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN. El mayor peso fresco en los callos se observó a partir de explantes de raíces, en el medio constituido por 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN. Todos los callos obtenidos en el medio basal B5 fueron de consistencia friable.

Dentro de los medios de regeneración evaluados, únicamente el medio basal MS con una concentración de 1.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP indujo puntos verdes, en los callos derivados de embrión obtenidos en los medios de inducción de callo que contenía el medio basal MS. Los callos que contenían los centros de regeneración, presentaron coloración verde claro en todas las concentraciones evaluadas de ANA y BAP. Mientras que los puntos verdes, no mostraron desarrollo adicional en el medio basal MS sin reguladores del crecimiento. En este estudio no fue posible la regeneración de plantas de frijol.

1. INTRODUCCION

El frijol (Phaseolus vulgaris L.) es uno de los granos más importantes en la dieta alimenticia de la población guatemalteca, especialmente la de escasos recursos.

No obstante lo trascendental del cultivo, aún no se cuentan con variedades que satisfagan las exigencias de los agricultores. Los promisorios avances del cultivo de tejidos en otras especies vegetales confiere la posibilidad de que el cultivo in vitro sea utilizado en los programas convencionales de mejoramiento del frijol en nuestro medio. Para la aplicación con éxito del cultivo de tejidos, se hace imprescindible evaluar diferentes medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas; estudiar la respuesta de los explantes a la inducción de callo y el comportamiento de los callos en cuanto a la regeneración de plantas.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Esta investigación comprendió las fases de inducción de callo y regeneración de plantas. En la primera fase se evaluaron las respuestas de explantes de embrión, raíz e hipocotilo de frijol (Phaseolus vulgaris L.) variedad Quinack Ché a la inducción de callo en diferentes medios de cultivo. Los medios de inducción evaluados fueron el medio basal Murashige y Skoog (MS) suplementado con seis combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y N⁶furfuril aminopurina (KIN) y el medio basal Gamborg et al (B5) más seis combinaciones de los reguladores del crecimiento 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y KIN.

La segunda fase comprendió la evaluación de cinco medios de regeneración a partir de los callos obtenidos en cada medio basal, MS y B5 de la primera fase.

Los resultados en cuanto a la inducción de callo en los medios que

contenían el medio basal MS, indican que la mayor eficiencia se obtuvo de explantes de hipocotilo en un medio que contenía 5.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN; en tanto que los callos con mayor peso fresco se alcanzaron en los medios que contenía 5.0 mg/l de ANA y 3.0 mg/l de KIN, el embrión como explante indujo los callos con mayores pesos fresco. Los callos desarrollados en el medio basal MS fueron generalmente compactos. Por otro lado la mayor inducción de callo se obtuvo cuando se utilizó la raíz como explante en los medios que contenía el medio basal B5 y los reguladores en las concentraciones siguientes: 0.1 y 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN. El mayor peso fresco se obtuvo de explantes de raíces en el medio basal B5 con 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN. Los callos desarrollados en el medio basal B5 fueron friables.

En la fase de regeneración de plantas, no fue posible regenerar plantas a partir de callo, sin embargo se observaron centros de regeneración en el medio que contenía 1.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de bencil aminopurina (BAP) estos callos se originaron de explantes de embrión, desarrollados en el medio basal MS de la primera fase.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inducción de callo y luego la regeneración de plantas en Phaseolus vulgaris L. sigue siendo la principal preocupación de los investigadores del mundo, mientras no se tenga resuelto este problema no se podrá aplicar la técnica del cultivo in vitro en el mejoramiento del frijol.

Los logros obtenidos en esta especie aún son limitados. Crocomo et al (11,28) regeneraron dos plantas de nueve cultivares evaluados, pero el medio no fue universal para otras variedades. Muñoz (22) regeneró plantas, pero en relativos silvestres de Phaseolus; Ruíz y Peláez, Ramos y Saunders et al (26,23,29) lograron regenerar brotes y raíces; mientras que Allavena y Rossetti (3), Schieren y Jacobsen (30), Breuer (7), Saunder et al (29) y Martins y Sondahl (18) observaron embriones somáticos, estructuras semejantes a embrioides en estado de torpedo, estructuras globulares y células embriogénicas. Desarrollados en diferentes medios de cultivo; explantes y cultivares. La respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas dependen del medio de cultivo, del tipo de explante, de la especie y del cultivar utilizado.

A pesar de la importancia que el frijol representa para la dieta de la población, aún no se han realizado trabajos sobre el comportamiento de nuestras variedades en cuanto a la inducción de callo y regeneración de plantas. Por todo lo anterior existe la necesidad de evaluar tipos de explantes de frijol en diferentes medios de inducción de callo y regeneración de plantas. La presente investigación pretende encontrar los explantes y los medios de cultivo que induzcan callo y que regeneren plantas. Para la realización de la investigación se ha tomado la variedad Quinack Che por ser ésta una de las más cultivadas por los agricultores del altiplano de Guatemala, gracias a su moderada precosidad y a su tolerancia a las enfermedades Uromyces phaseoli, Ascochyta sp. y Colletotrichum lindemuthiana, las cuales son las más importantes.

3. MARCO TEORICO

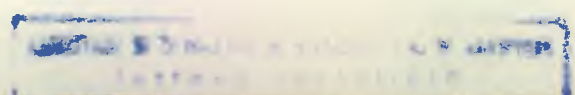
3.1 La biotecnología. Antecedentes, desarrollo y perspectivas.

El comienzo de la ingeniería biológica a finales del siglo XX (6), llega a ser la más grande revolución en la historia de la humanidad. Los avances en la última década han sido notables, tales como la producción de insulina, hormonas del crecimiento, interferón, vacunas, enzimas, trabajos en la cirugía genética y empalme genético, estudios en lixiviación de minerales cupríferos. En la agricultura, la biotecnología esta desarrollando una promisoría actividad en el campo de los biofertilizantes, bioinsecticidas, en algas microscópicas y en las especies superiores se han producido plantas de algodón (Gossypium hirsutum L.) sin semillas mediante manipulación genética; se han creado plantas híbridas, por ejemplo el cruce entre papa (Solanum tuberosum) por tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) obteniéndose el pamate. En el futuro será posible mejorar los cultivos proporcionando a las plantas la resistencia necesaria para hacer frente a los herbicidas, a los insectos, las enfermedades, la deficiencia de agua, las bajas temperaturas y otros problemas ambientales.

3.2 Desarrollo del embrión, raiz e hipocotilo

Bidwel (5) indica que el cigote es capaz de originar un nuevo organismo completo. Pero después de una división cada célula hija tiene una predisposición morfogénica. Si se separan las dos células hijas, cada una recobra la capacidad de dar un organismo completo. Esta capacidad de crecer o predisposición morfogénica no es tan solo una característica de las células aisladas.

Poco después que se forma el cigote empieza a crecer más o menos rápidamente y se desarrolla formando un embrión, y como tal descansa



hasta la germinación de la semilla.

El desarrollo del endospermo precede al crecimiento del embrión, el endospermo nutre al embrión durante el desarrollo. Más tarde, por lo general, se forma las paredes celulares y el endospermo se vuelve sólido. Después de esto normalmente empieza el desarrollo del embrión.

La división celular inicial del cigote forma dos células, una de las cuales formará al embrión y la otra al suspensor. El suspensor sirve para mantener el anclaje u orientación del embrión y para que se introduzca en la masa del endospermo del que deriva su nutrición.

El embrión pasa a través de los estadios globoso, de corazón y de torpedo. Los dos lóbulos del estadio de corazón forman los cotiledones y en el estado cotiledonar el embrión ya ha desarrollado una radícula o meristemo radical y un meristemo del tallo.

Durante los inicios del crecimiento el nivel de organización celular del embrión se incrementa desde el cigote hasta un nivel muy alto en el embrión maduro. En este periodo el embrión se desarrolla de una sola célula totalmente heterótrofa a una unidad autótrofa capaz de desarrollarse posteriormente por si sola.

Bidwel (5) manifiesta que la raíz en crecimiento, primaria, secundaria o adventicia, puede dividirse, en general en tres regiones: la región meristemática, donde tiene lugar la multiplicación celular, la región de alargamiento y diferenciación donde prosigue en menor grado la división celular y la región de alargamiento y diferenciación donde prosigue en menor grado la división celular y la región de maduración. El extremo de la raíz esta protegido por la caliptra. El centro quiescente del meristemo contiene frecuentemente una reserva de células embrionarias que se dividen con lentitud. Columnas de células de la región embrionaria se extienden longitudinalmente para producir la estructura característica de la raíz. Algunas células se alargan mucho

más que otras las que, por lo tanto, deben crecer por divisiones adicionales. Las regiones de división, alargamiento y maduración tienden a superponerse.

En las dicotiledóneas, el floema primario se emplaza entre los extremos de la estrella de xilema. Fuera del floema hay una capa de células, el periciclo, que tiene su actividad meristemática, el periciclo dá origen a raíces laterales. La división celular en el periciclo forma un nuevo primordio radical que crece a través de la corteza, ya sea mecánicamente, abriéndose paso por la fuerza ya sea enzimáticamente, por digestión de las células corticales frente a él. Los tejidos en la base de la raíz lateral forman conexiones vasculares con la estela de la raíz principal.

Bidwel (5) indica también que la parte del embrión y la plántula situada entre los cotiledones y la radícula se denomina hipocotilo.

La mayoría de los meristemos apicales contienen dos zonas principales: la túnica, con una o varias capas de células organizadas en hileras normales en la superficie del meristemo, y el cuerpo, una masa de células, dispuestas con menos orden, por abajo de la túnica. Las células de la túnica se dividen usualmente en planos perpendiculares a la superficie del meristemo, mientras que las células del cuerpo lo hacen en muchos planos diferentes. La túnica por lo regular da origen al tejido epidérmico y el cuerpo, a la masa de tejido interno de tallos y hojas.

Las zonas de división celular, alargamiento y maduración se encuentran en la punta del tallo, pero no están claramente separadas. Ello se debe a que el meristemo produce no sólo el tallo, sino también hojas y ramas de vástagos mediante excrecencias de tejido del margen del meristemo apical. Los tallos de dicotiledóneas son más complejas y son capaces de crecimiento secundario. El crecimiento secundario tiene lugar

a causa del cambium mediante divisiones tangenciales a la circunferencia del tallo, dando origen a células nuevas de floema hacia el exterior y células xilemáticas nuevas hacia el interior.

3.3 Inoculación e iniciación del callo

Muñoz (22) indica que el explante proveniente de una porción vegetal, se esteriliza y se introduce en los frascos que contienen el medio de cultivo en donde se iniciarán los callos. La proliferación del callo se puede iniciar casi de cualquier porción vegetal.

Hurtado, Ramos y Thorpe (12, 23, 33) indican que los reguladores del crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo del callo son: ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftalen acético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 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 de cultivo, 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.

El balance de auxinas y citoquininas en el medio 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 de mayor concentración entonces se desarrollarán los primordios radiculares y la concentración equilibrada de ambos inducirá el incremento del callo.

3.4 Cambios en el cultivo del callo

Hurtado (12) indica que los cambios que ocurren a nivel celular se dividen en cuatro periodos: inducción, proliferación celular, inducción de la diferenciación y envejecimiento. Durante la inducción las células del inóculo comienzan su crecimiento tanto en número como en tamaño; en la etapa de proliferación celular el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo; durante la fase de inducción de la diferenciación se obtienen meristemos apicales y radicales, embrioides y tejido vascular; la etapa de senescencia se caracteriza por la pérdida de capacidad del crecimiento en el callo.

3.5 Morfología y citología del callo

Hurtado, Ramos y Thorpe (12, 23, 33) concluyen que el callo proviene de explantes de órganos y tejidos diferenciados que posteriormente son desdiferenciados, las células presentan una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejidos. Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares llamados friables.

La pigmentación del callo esta determinada por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos y antocianinas, entre otros, se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros son de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo.

Las células de las plantas tienen el potencial para diferenciarse,

dividirse y desarrollar órganos y plantas completas, siempre que se suministra un balance adecuado de los reguladores del crecimiento y un buen manejo del cultivo ya que morfológicamente la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células.

3.6 Medios de cultivo

Hurtado y Thorpe (12, 33) dicen que el punto de partida para que la técnica del cultivo de tejidos pueda ser aplicada con éxito es el uso del medio nutritivo adecuado, uso de sustancias químicas necesarias, combinaciones apropiados de los nutrientes y el empleo de tejidos viables en condiciones de cultivo adecuados. Un medio de cultivo esta compuesto por los siguientes ingredientes: sales inorgánicas, fitohormonas, fuentes de energía y carbono, fuentes de nitrógeno, vitaminas y materiales inertes de soporte.

3.6.1 Sales inorgánicas

Hurtado (12) indica que los requerimientos de sales inorgánicas de una célula en el cultivo de tejidos son los mismos que los necesitados por una planta normal. El medio Murashige y Skoog es el más adecuado para el cultivo de muchas especies, debido a las cantidades de macronutrientes indispensables para el crecimiento y desarrollo celular. Los macronutrientes nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y magnesio son requeridos en cantidades milimolares.

3.6.2 Reguladores del crecimiento

Hurtado (12) indica que las citoquininas y las auxinas son los principales reguladores del crecimiento en el cultivo de tejidos, los cuales pueden ser naturales o sintéticos. La concentración de citoquinina usada va de 0.03 a 30 mg/l y las auxinas de 0.1 a 10 mg/l, variando según la especie y de los fines que se persiguen. Las

citoquininas más usadas son: N⁶bencil aminopurina (BA), N⁶dimetil alil aminopurina (2iP), N⁶furfuril aminopurina (KIN o cinetina), N⁶(4-hidroxi, 3-metil, 2 butenil) adenina (zeatina) y las auxinas utilizadas son: Acido 3-indolacético (AIA), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 4-diclorofenoxiacético (CPA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5-tricloropicolínico.

3.6.3 Nitrogeno orgánico

Thorpe (33) dice que la fuente común del nitrógeno orgánico en los medios incluye aminoácidos, glutamina, asparagina y adenina. Una cantidad de 0.02 a 0.1 % de caseína hidrolizada o vitamina libre es adicionado también.

3.6.4 Vitaminas

Hurtado (12) asegura que las plantas sintetizan sus propias vitaminas para su crecimiento y desarrollo; la tiamina es la de mayor importancia, pero otras pueden estimular procesos de crecimiento específicos.

3.6.5 Materiales inertes o de soporte

Hurtado y Thorpe (12, 33) indican que los materiales inertes o de soporte constituyen los substratos en el cultivo de tejidos. El agar es el más usado por proveer un gel húmedo, los demás como la poliacrilamida y la sílica gel son menos usados. El papel filtro se utiliza como soporte en los medios líquidos. Las sustancias de desecho en los medios de cultivo son eliminados con carbón activado en bajas concentraciones.

Hurtado (12) indica que además de los ingredientes mencionados, existen otros compuestos orgánicos como los hexitoles, la adenina o el sulfato de adenina, las bases nitrogenadas (ácido citidílico y guanílico), ácido cítrico, ascórbico y ácido málico evitan la oxidación.

Los complejos naturales han sido empleados para enriquecer los medios de cultivo, entre los cuales estan: pulpa de plátano, endospermo y agua de coco, emulsión de pescado, extracto de malta, jugo de naranja, hidrolizado proteico (caseina, lactoalbúmina, peptona y triptona), jugo de tomate y extracto de levadura.

3.7 Algunas investigaciones realizadas sobre el cultivo de tejidos en frijol.

Inducción de callo. Veliky y Martins, citados por Sharp (28) realizaron estudios para la inducción de callo sobre diferentes medios de cultivo, utilizando bajas y altas concentraciones de sales basales.

Liau y Boll (16, 23) establecieron un medio sólido para el cultivo de callos derivados de explantes de raíces, hipocotilos y cotiledones, ellos definieron que dichos tejidos tenían un comportamiento similar en su apariencia morfológicas y la misma respuesta frente a diferentes medios. La máxima tasa de crecimiento ocurrió entre 8, 12, y 17 días, en el medio sólido fue más tardío, no obstante que las divisiones celulares comienzan 24 horas después de la inoculación, otros autores aseveran que la formación del callo y diferenciación radical varían con la concentración de sales. En el trabajo de Kerns et al (15), cuando hicieron cultivo de células en suspensión de explantes provenientes de hipocotilo y cotiledón se indujeron callos, pero hubo marcada diferencia morfológica entre algunas variedades.

El tejido del epicotilo de soya fue usado por Jacobsen et al y Kerns et al (13, 15) para el cultivo de células en suspensión, todos los cultivares fueron mantenidos sobre medio Gamborg et al (B5) más 1 mg/l de 2,4-diclorofenoxiacético, a 25 grados C en un lugar obscuro y sobre un agitador. Jacobsen et al y Kerns et al (13, 15), tuvieron éxito en la inducción de callo en el cultivo de células en suspensión utilizando

hipocotilo de soya, ellos notaron diferencias morfológicas entre las variedades empleadas como ocurrió en el epicotilo.

Chatfield, Liau y Sharp (8, 16, 28) reportaron el uso del hipocotilo para la inducción de callo, los explantes se inocularon en el medio de Murashige y Skoog, suplementados con compuestos orgánicos, también evaluaron otros medios, pero el comportamiento del hipocotilo en relación con los explantes de raíz y cotiledón fueron similares en cuanto a la apariencia morfológica y respondieron igual en los otros medios.

Ramos (23) hizo cultivos de epicotilos provenientes de cinco cultivares de frijol sobre los medios PC-L2, Blaydes, Gamborg et al y S. A los 10 días los callos se transfirieron a los medios PC-L2 con mayor contenido de auxina y al medio Blaydes sin hormonas. Los resultados indican que un mismo medio produjo índice de crecimiento relativo (ICR) diferentes en cada uno de los cultivares ensayados. Lo que sugiere que el factor genético del cultivar se manifiesta ante determinado medio nutritivo, lo cual puede comprobarse comparando la respuesta de los genotipos en los demás medios. Probablemente esta respuesta está condicionada con la actividad específica de los reguladores ante un determinado genotipo.

Liau y Boll (16) hicieron una comparación del crecimiento en el cultivo de tejidos en frijol inoculando piezas de raíz, hipocotilo y cotiledón sobre diferentes medios basales. En el medio L1 se obtuvieron bajos rendimientos, los altos rendimientos se produjeron en el medio Murashige y Skoog. Los explantes de raíces produjeron rápidamente muchas raíces, los hipocotilos mostraron un ligero color amarillo parduzco, el crecimiento rápido de todos los cultivos ocurren entre 1 a 2 semanas, y sus curvas de crecimiento de callos son muy similares. En cuanto al crecimiento en peso fresco y peso seco no fueron paralelos.

Ramos (23) observó que el incremento en el peso de los callos era

favorecido por la textura friable del callo, debido a que mayor número de células entran en contacto con el medio de cultivo. Los pesos alcanzados por todos los callos fueron bastante similares entre sí en callos originados de tejido foliar.

Mok y Mok (20, 28) evaluaron la respuesta genotípica del frijol frente a 4 auxinas y 7 genotipos de Phaseolus vulgaris L., Phaseolus lunatus L. y Phaseolus acutifolius L. Fue usado el medio Murashige y Skoog. El picloram fue efectivo en promover el crecimiento del callo. Los tejidos de algunos genotipos crecieron bien entre 1.25 a 40 uM y no hubieron diferencias en cuanto al peso frente a varias concentraciones de picloram, el 2,4-diclorofenoxiacético también incrementó el crecimiento del callo, pero en menos rango de concentraciones entre 1.25 a 20 uM. El ácido naftalenacético indujo el crecimiento del callo a concentraciones relativamente altas entre 10 a 40 uM. Y el ácido indol-3-acético presentó ineffectividad en soportar el crecimiento del callo, el cual fue de color café en cada periodo de cultivo, al llegar a las 3 semanas se puso necrótico completamente.

Mok y compañeros (21) estudiaron las relaciones de las estructuras de 8 citoquininas en la inducción de callo en 2 genotipos, uno en Phaseolus vulgaris L. y otro en Phaseolus lunatus L. El rasgo estructural que más contribuye a la mayor diferencia genotípica en la relación de la actividad de acuerdo a la estructura de la citoquinina es la presencia o ausencia de una doble ligadura en la posición 2,3 de N⁶ isoprenoide. Trans-zeatina e hidrozeatina fueron los más activos en la inducción de callos. Los reguladores sugieren la posibilidad de emplear la estructura de las citoquininas para distinguir genotipos diferentes en la función y metabolismo de la citoquinina.

Mok y Ruiz et al (20, 25) en un estudio realizado acerca de los

efectos de las fitohormonas y la respuesta de explantes para la producción de callo, la auxina en el medio generalmente promueve una buena formación de callo, pero regularmente suprime la regeneración de plantas. El 2,4-diclorofenoxiacético (2 mg/l) produjeron callos grandes y friables. El ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-acético (AIA) mostraron poco efecto ya sea solos o combinados con alguna citoquinina. Los callos formados fueron pequeños y friables, cuando fueron transferidos a otro medio, no crecieron, Mok y Mok vieron similares resultados, con la diferencia que el ANA dió buenos resultados. La combinación de 2,4-diclorofenoxiacético con la citoquinina benciladenina no afectó alguna morfología y hábito de crecimiento del callo. La eliminación del 2,4-diclorofenoxiacético en la ausencia de otras sustancias de crecimiento promovió el deterioro del cultivo, muriéndose muy temprano. En cuanto a los explantes, el 2,4-diclorofenoxiacético promovió la formación de callo fácilmente, en explantes de hipocotilo. Ruiz et al (25), observaron que en los genotipos había también diferencias en la producción de callos.

Crepy y compañeros (9) estudiaron el comportamiento de callos en 2 medios basales, cuando los callos fueron transferidos a un medio sólido BSB, ocurrió un incremento en la masa de células, después de 3 semanas, al inicio el callo era de color café, pero por último se necrosó totalmente. En el segundo medio MS con adiciones de agua de coco, 2,4-diclorofenoxiacético (0.05 mg/l), ácido naftalenacético (0.1 mg/l) y benciladenina (0.5 mg/l), los callos permanecieron verdes durante 6 semanas y no presentaron necrosis. La presencia del 2,4-diclorofenoxiacético determinó la sobrevivencia de los callos.

Los callos producidos por Crocomo y compañeros (10) fueron iguales en su crecimiento frente a varias concentraciones de sucrosa, pero la presencia de la caseína hidrolizada pareció necesaria para que ocurriera

el crecimiento del callo, mientras que la presencia de 2,4-diclorofenoxiacético produjo mucho crecimiento de los callos.

Ruiz y Peláez (26) hicieron un estudio comparativo de la formación de callos en explantes de meristemo, epicotilos, catáfila e hipocotilo de Phaseolus vulgaris L. y Phaseolus coccineus L. Todos los cultivares y explantes formaron callos eficientemente en el medio con 2,4-diclorofenoxiacético, los cuales fueron los más grandes, pero en Phaseolus vulgaris L. fueron relativamente pequeños, en cambio con el ácido naftalenacético y benciladenina se produjeron callos más frecuentemente. El hipocotilo produjo callos más grandes. Y el cultivar riñón morado fue el que presentó alta frecuencia en la formación de callos.

Morfogénesis. Bidwel y Smith (5, 31) indican que se obtiene cierto éxito en el cultivo de embriones en medios sintéticos complejos si están presentes varias condiciones. Los embriones muy temprano requieren un potencial osmótico bajo, pero el requerimiento baja al madurar el embrión. Los factores más importantes son los reguladores del crecimiento que deben estar bien balanceados.

Bidwel y Muñoz (5, 22) indican que el cigote y las células derivadas de un cultivo de embrión aislado son las que pueden regenerar, pero las células derivadas de partes de la planta más maduras o diferenciadas tienen una respuesta restringida a la regeneración.

Muñoz y Sharp (22, 28) manifiestan que son muchos los reportes sobre la dificultad de regenerar plantas a partir de callos utilizando genotipos cultivados de Phaseolus vulgaris L.

Crocomo y compañeros (11, 28) cultivaron explantes de hojas en el medio usado por Veliky y Martins más ácido indolacético (11.2 uM, ácido naftalenacético (5.4 uM) y cinetina (0.9 uM), y además se adicionó 1/4 de

extracto de semilla de frijol/ml. Dos plantas se pudieron regenerar de 9 cultivares experimentados de Phaseolus vulgaris L. En los otros ensayos cuando se adicionó el extracto de 1/4 de semilla de frijol fueron notables el incremento del callo y la morfogénesis de raíz.

Allavena y Rossetti (3) observaron embriones somáticos sobre callos originados de embriones inmaduros provenientes de 2,4-diclorofenoxiacético (2.2 mg/l) y cinetina (0.2 mg/l), estos fueron transferidos en el segundo medio con 0.1 mg/l de ácido naftalenacético y 0.5 mg/l de cinetina, algunos de los callos produjeron estructuras parecidas a embriones. En el segundo ensayo se usaron callos producidos sobre 2,4-diclorofenoxiacético (4, 6 mg/l), se transfirieron para la regeneración sobre un medio conteniendo ácido naftalenacético (0.1 mg/l), cinetina (0.5 mg/l), ácido benciladenina (0.03 mg/l) y ácido giberélico (GA₃) (0.1 mg/l). En todos los experimentos se obtuvieron estructuras parecidas a embriones solamente con la presencia del ácido giberélico en uno de los cultivares, pero en el otro cultivar no se observó estructuras de regeneración, sobre las células verdes.

En 2 cultivares evaluados por Ramos (23) el 20 % de los callos desarrollados en el medio Blaydes produjeron rizogénesis a los 17 días sobre el medio B-2Y en la segunda transferencia, esto puede ser debido a la mayor concentración de auxina en el medio inicial y al comportamiento de crecimiento bajo del índice de crecimiento relativo, al inicio del desarrollo del callo.

Sharp (28) hizo estudios sobre el efecto de la cafeina y nicotina en el crecimiento y morfogénesis de raíces de Phaseolus vulgaris L., él observó que la nicotina sin la presencia de reguladores de crecimiento fue inhibidor de la inducción de raíz, sobre el medio basal sin cinetina pero con otros reguladores, fue incapaz de fomentar el crecimiento del callo, el efecto estuvo asociado con la inducción de raíz. En cuanto a

la cafeína su comportamiento fue antagónico al desarrollo de callo y morfogénesis.

Saka y Wright (27, 35) trabajaron en la soya (Glycine max Merr.), ellos cortaron raíces axilares a nivel del nudo a los 14 días de germinado, luego los subcultivaron y al cuarto subcultivo produjeron raíces. Los medios iniciales fueron la sal de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración más benciladenina (5 μ M), y la otra mitad sin hormonas suplementarias.

Sreedhar (32) obtuvo diferenciación morfológica en explantes de hipocotilo y epicotilos de frijol (Phaseolus lunatus L.) cultivados en el medio Gamborg et al suplementados con bencilaminopurina (2 mg/l) y cinetina (0.5 mg/l) a las dos semanas de cultivo.

Allavena y compañeros (1) usaron explantes de cotiledones inmaduros cuando tenía 15 días después de la antesis, los cuales fueron inoculados sobre medio Murashige y Skoog más ácido benciladenina y DHZ, haciendo pretratamientos a las 6, 24 y 48 horas. Las regeneraciones observadas en este estudio se consideraron originados del explante. En algunas instancias fueron observados más de un centro de regeneración por cada callo. Ellos indican que aún no existe un medio completamente definido para la regeneración vía embriogénesis somática en Phaseolus vulgaris L. Las hormonas evaluadas aquí fueron el ácido benciladenina, ácido indolacético, ácido naftoxido, N^o dimetil alil aminopurina, ácido indolbutírico, ácido naftalenacético y benciladenina.

Schieren y Jacobsen (30) indujeron callos para la regeneración sobre el medio basal RB más picloram (0.38 mg/l), luego se transfirieron en el medio RB más picloram (1 mg/l) durante 12 horas en forma de pretratamiento, después se inocularon sobre el medio RB más benciladenina (4 mg/l) y 0.1 mg/l de ácido indolbutírico. Entre los 5 y 14 días se

observaron estructuras parecidos a embrioides. Ocasionalmente aparecieron embrioides en estado de torpedo en el medio de suspensión. Aún no existe un medio universal para desarrollar la regeneración en todas las especies, incluyendo al frijol común Phaseolus vulgaris L.

Los resultados obtenidos por Saunders y compañeros (29) indican que fueron producidos raíces, callos y estructuras globulares a partir de explantes de hojas primarias y del extremo distal de cotiledones que fueron cultivados sobre medio semisólido de Murashige y Skoog más 2,4-diclorofenoxiacético (3 o más mg/l), luego se subcultivaron sobre medio con 30 mg/l de 2,4-diclorofenoxiacético, las estructuras incrementaron su peso al doble y de un color verde opacos. En los explantes de cotiledones no desarrollaron raíces.

Angelini y Allavena (4) hicieron estudios en la regeneración de plantas usando explantes de cotiledones inmaduros de frijol (Phaseolus coccineus L.) cultivados en experimentos previos por micropropagación, el 37.5 % de regeneración fue observado en el medio Murashige y Skoog más 2-isopentil adenina (10 mg/l) y ácido 2-naftoxiacético (NOA) (0.05 mg/l), de acuerdo a los resultados obtenidos se confirma el potencial morfogénico de los cotiledones inmaduros de Phaseolus coccineus L.

Breuer (7) observó estructuras de tipo torpedo sobre el medio RB1 suplementados con benciladenina y picloram, en cambio sobre el medio basal de Murashige y Skoog no se observaron estructuras de regeneración. Para la inducción de callos, él utilizó segmentos de hojas y los cultivó sobre el medio Murashige y Skoog más 0.2 mg/l de benciladenina y diferentes concentraciones de picloram. Callos de diferentes edades se transfirieron a un medio líquido sin picloram y en suspensión, para evitar la necrosis de los callos se subcultivaron en el medio RB1.

Breuer (7) indica además que la inducción de callos depende del

genotipo y de la concentración de picloram en el frijol Phaseolus vulgaris L. El cambio de medio aumentó el potencial del tejido para la formación de embrioides, aunque aún no se ha podido llegar a la regeneración de plantas.

Martins y Sondahl (18) transfirieron los callos obtenidos de explantes de brotes apicales al medio líquido PC-L2 con 10 μ M de 2,4-diclorofenoxiacético y caseína hidrolizada (2 g/l) esto fue suficiente para el mantenimiento de las células, una segunda transferencia se efectuó en un medio líquido conteniendo cinetina (0.5 mg/l), 2,4-diclorofenoxiacético (0.2 mg/l) y caseína hidrolizada obteniéndose una producción de embrioides somáticos a un estado temprano de desarrollo, pero sólo en tres cultivares. Las estructuras globulares, células embriogénicas y embrioides somáticos no dieron un desarrollo adicional cuando se transfirieron sobre un medio líquido.

La regeneración de brotes fue observado por Ruiz y Peláez (26) en los medios L4 y L7 y MS5 más ácido indolacético (2.25 mg/l) y ácido naftalenacético (0.18 mg/l), derivados de 4 explantes de frijol Phaseolus vulgaris L.

Muñoz (22) logró la regeneración de plantas completas en otras leguminosas, en relativos silvestres de frijol P. neglectus L., P. scarabellus L., P. santotrichus L., P. pedicellatus y P. glaucocarpus L., con el uso de callos originados de nudo cotiledonar cultivados sobre la mitad de las sales de Murashige y Skoog más ácido indolacético (para inducir callo), luego regeneró sobre el medio Gamborg más ácido indolacético, ácido giberélico y bencilaminopurina. Ella indica que la regeneración de plantas está influenciado por el genotipo, clase de tejido utilizado como explante y el medio de cultivo. Por esto los esfuerzos de los investigadores del mundo estan concentrados en el estudio de estos factores.

Muñoz (22) indica que la micropropagación se utiliza para una rápida multiplicación de plantas híbridas, rescate de mutantes, multiplicación de germoplasma valioso con número reducido de semillas.

McClellan y Grafton (19) desarrollaron plantas de frijol usando el tejido del nudo cotiledonar, germinados en el medio de Murashige y Skoog más 5 μM de benciladenina. Los estudios histológicos revelan que los retoños se originan de las células del parenquima subepidermal del nudo, confirmando la naturaleza adventicia de estas estructuras.

Kartha (14) obtuvo múltiples retoños a partir de meristemos de frijol en el medio de Murashige y Skoog más 10 μM de benciladenina y con el ácido naftalenacético la producción de plántulas fue inferior.

Martins y Sondahl (17) tomaron inóculos de 33 cultivares y los establecieron sobre el medio Gamborg más benciladenina (0.5 μM) los cultivares produjeron callo, raíces y retoños adventicios de acuerdo al genotipo. Los retoños adventicios desarrollaron de acuerdo a las condiciones del cultivo. Sólomente 12 cultivares produjeron retoños.

Rublo y Kartha (24) evaluaron la respuesta morfogénica de meristemos apicales de 3 especies de *Phaseolus*. Los meristemos de *Phaseolus vulgaris* L. exhibieron la mejor respuesta en términos de regeneración de brotes cuando se cultivó en el medio con benciladenina (10 μM) y ácido indolacético o ácido indolbutírico en la misma concentración, a una temperatura constante de 26°C. La sucrosa sola a un nivel de 5 % pareció estar adecuado para la reducción del crecimiento, esto facilita en corto término la preservación de los meristemos de *Phaseolus vulgaris* L.

Allavena y Rossetti (2) evaluaron 4 genotipos, 2 tipos de explantes y varios factores de crecimiento en el medio basal Murashige y Skoog. Una alta concentración de benciladenina forzó la reducción del porcentaje de

explantes axilares elongados, con L-metionina (0.1 mg/l) y L-cisteína-HCl (0.1 mg/l) adicionado separadamente al medio decreció el porcentaje de explantes elongados. Ellos notaron que el genotipo influyó en la micropropagación de plántulas.

Honma, citado por Sharp (28) utilizando el híbrido producto del cruce entre Phaseolus vulgaris L. y Phaseolus acutifolius L. en el medio basal White más sucrosa (0.12 M) en donde se obtuvieron raíces y brotes y cosechó semillas viables. También obtuvo plantas completas del híbrido entre P. vulgaris L y P. ritensis L. los que fueron cultivados en los medios Tomaszewki y White, los embriones jóvenes crecieron mejor en el medio White más 0.088 M de sucrosa, en cambio los embriones viejos crecieron rápidamente cuando se añadió 0.014 M de sucrosa.

Crocomo et al (10) indican que la glutamina favorece el desarrollo de embriones inmaduros en híbrido de frijol cultivado en medio Murashige y Skoog, la concentración de glutamina fue de 0.07 y 0.7 uM, además adicionaron al medio 0.1 uM de ácido giberélico.

4. OBJETIVOS

1. Evaluar diferentes medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas en frijol (Phaseolus vulgaris L.) variedad Quinack Che.
2. Estudiar la respuesta de los explantes provenientes de embriones, raíces e hipocotilos a la inducción de callo y el comportamiento de estos callos en la regeneración de plantas de frijol variedad Quinack Che.

5. HIPOTESIS

1. Existe por lo menos un medio de cultivo que induce la formación de callo en por lo menos un tipo de explante proveniente de frijol (Phaseolus vulgaris L.). variedad Quinack Che.
2. Todos los medios de cultivo inducen la regeneración de plantas en los callos originados de explantes de embriones, raíces e hipocotilos.

6. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Para la ejecución del mismo se emplearon los siguientes materiales y la metodología que se indica.

6.1 Material vegetal

Se utilizó la variedad de frijol Quinack Che por poseer características agronómicas deseables como la tolerancia a enfermedades como: Uromyces phaseoli, Ascochyta sp. y Colletotrichum lindemuthianum y por su moderada precosidad. Se usó semilla de 60 días de cosechada, la cual fue producida en la estación experimental del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas de Chimaltenango. Sus características se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1 Principales características del frijol, variedad Quinack Che.

Progenitores	Compuesto chimalteco 3 x Línea Ef 2164
Días a antesis	52 días
Duración de la floración	50 días
Color predominante de la flor	lila (33)
Hábito de crecimiento	tipo II
Altura de cobertura	36 cms
Color predominante del tallo	verde
Tipo predominante de ramificación	abierto
Area foliar	51 cms cuadrados
Color predominante de la hoja	verde
Días a madurez fisiológica	92 días
Color predominante de las vainas a madurez	amarillo
Días a la cosecha	118 días
Longitud de las vainas	10.41 cms
Ancho de las vainas	0.93 cm
Color predominante de las vainas secas	café (14)
Número de vainas por planta	19 vainas
Número de semillas por vaina	6
Color de la semilla	negro
Aspecto predominante de la testa	intermedio
Color del hilio	sin colorear
Forma de la semilla	alargada ovoide
Peso de 100 semillas	22 gramos
Rendimiento promedio	1.7 TM/Ha.

Fuente: Soto, J.J. Programa de frijol, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas.

Los explantes que se evaluaron se obtuvieron a partir de embriones, raíces e hipocotilos. Los embriones se extrajeron de semillas remojadas durante 24 horas y las raíces e hipocotilos se seccionaron de plántulas de tres días en proceso de germinación sobre agar.

6.2 Fases del estudio

El estudio se llevó a cabo en dos fases: la primera fase comprendió la evaluación de medios de inducción de callo y la segunda fase fue la evaluación de callos derivados de los explantes de embrión, raíz e hipocotilo, en medios de regeneración.

6.2.1 Fase de inducción de callo

La fase de inducción de callo comprendió la evaluación independiente de 2 medios basales, el primer medio basal estuvo constituido por las sales basales de Murashige y Skoog (MS) más seis combinaciones de reguladores del crecimiento de ácido naftalenacético (ANA) y N⁶furfuril aminopurina (quinetina, cinetina o KIN) y el segundo medio estuvo constituido por las sales basales de Gamborg et al (B5) suplementado con seis combinaciones de reguladores del crecimiento de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y N⁶furfuril aminopurina (KIN, cinetina o quinetina). En estos medios se estudió la respuesta de los de explantes originados de embrión (E), raíz (R) e hipocotilo (H), a la inducción de callo.

6.2.1.A Medios de inducción de callo

Los medios de inducción de callo evaluados estuvieron constituidos por los medios basales de Murashige-Skoog y Gamborg et al, para cada medio basal se tuvieron diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento los cuales se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2 Combinaciones de reguladores del crecimiento de ácido naftalenacético (ANA) y N⁶furfuril aminopurina (KIN) utilizado el medio basal Murashige y Skoog (MS). Y 2,4-diclorofenoixiacético (2,4-D) y N⁶furfuril aminopurina (KIN) usado en el medio basal Gamborg et al (B5).

Medio basal	Combinaciones reguladores del crecimiento, (mg/l)	
	ANA	KIN
Murashige y Skoog	0.5	0.5
	3.0	0.5
	5.0	0.5
	0.5	3.0
	3.0	3.0
	5.0	3.0
Gamborg <u>et al</u>	2,4-D	KIN
	0.1	0.5
	0.5	0.5
	1.0	0.5
	0.1	1.0
	0.5	1.0
	1.0	1.0

La composición química de los medios basales Murashige y Skoog y Gamborg et al se presentan en el cuadro 18 "A".

Se evaluaron 12 medios de inducción de callo, de los cuales seis estaban constituidos por el mismo medio basal.

6.2.1.B Tipos de Explantes

Los explantes evaluados fueron: embrión (E), raíz (R) e hipocotilo (H).

6.2.1.C Diseño experimental

Se usó un diseño experimental de bloques al azar con estructura bifactorial. Un factor estuvo constituido por los medios de inducción de callo que contenían un medio basal en común (Factor A=6) y el otro factor fueron los explantes (Factor B=3), lo cual representa 18 tratamientos para los medios de inducción de callo que contenían el medio basal Murashige y Skoog y 18 tratamientos para los medios de inducción de callo que contenían el medio basal Gamborg et al.

6.2.1.D Unidad experimental

La unidad experimental consistió de tres cajas de petrí conteniendo 5 explantes en cada caja. Fueron 18 tratamientos con 5 repeticiones lo cual sumaron 90 unidades experimentales para los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog y 90 unidades experimentales para los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al.

6.2.1.E Modelo estadístico

El modelo estadístico utilizado para un arreglo combinatorio bifactorial en bloques al azar fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + C_k + BC_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable respuesta

U = efecto de la media general de la población

A_i = efecto de los bloques

B_j = efecto del medio de cultivo

C_k = efecto de los tipos de explantes

BC_{jk} = interacción del medio de cultivo y tipo de explante

E_{ijk} = efecto del error experimental

6.2.1.F Distribución de los tratamientos

Los medios de cultivo y tipos de explantes en los 2 medios basales y sus reguladores del crecimiento fueron sometidos en un arreglo combinatorio, como se muestra en el cuadro 3.

Primero fue establecido el ensayo de los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog (MS) siguiendo la aleatorización que se muestra en el cuadro 4. Después se estableció el ensayo de los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al. (B5), con la misma aleatorización del cuadro 4.

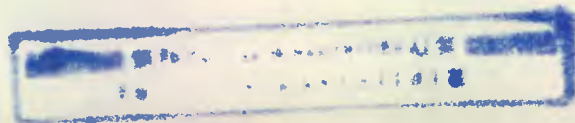
Cuadro 3 Arreglo combinatorio de los medios de inducción de callo ácido nafatalen acético y kinetina en el medio basal Murashige y Skoog y 2,4-diclorofenoxiacético y kinetina (mg/l) en el medio basal Gamborg *et al*, en ensayos independientes.

Medio basal	Acido naftalenacético	Kinetina	2,4-diclorofenoxiacético	Explante
Murashige	0.5	0.5	---	Embrión
	0.5	0.5	---	Raíz
y	0.5	0.5	---	Hipocotilo
	3.0	0.5	---	Embrión
Skoog	3.0	0.5	---	Raíz
	3.0	0.5	---	Hipocotilo
	5.0	0.5	---	Embrión
	5.0	0.5	---	Raíz
	5.0	0.5	---	Hipocotilo
	0.5	3.0	---	Embrión
	0.5	3.0	---	Raíz
	0.5	3.0	---	Hipocotilo
	3.0	3.0	---	Embrión
	3.0	3.0	---	Raíz
	3.0	3.0	---	Hipocotilo
	5.0	3.0	---	Embrión
	5.0	3.0	---	Raíz
	5.0	3.0	---	Hipocotilo
Gamborg <i>et al</i>	---	0.5	0.1	Embrión
	---	0.5	0.1	Raíz
	---	0.5	0.1	Hipocotilo
	---	0.5	0.5	Embrión
	---	0.5	0.5	Raíz
	---	0.5	0.5	Hipocotilo
	---	0.5	1.0	Embrión
	---	0.5	1.0	Raíz
	---	0.5	1.0	Hipocotilo
	---	1.0	0.1	Embrión
	---	1.0	0.1	Raíz
	---	1.0	0.1	Hipocotilo
	---	1.0	0.5	Embrión
	---	1.0	0.5	Raíz
	---	1.0	0.5	Hipocotilo
	---	1.0	1.0	Embrión
---	1.0	1.0	Raíz	
---	1.0	1.0	Hipocotilo	

Cuadro 4 Aleatorización de los medios de inducción de callo (ANA/KIN) (2,4-D) y tipos de explantes en los medios basales Murashige-Skoog y Gamborg, en ensayos independientes.

BLOQUE I		BLOQUE II		BLOQUE III		BLOQUE IV		BLOQUE V	
MS	B5	MS	B5	MS	B5	MS	B5	MS	B5
5E	9E	6R	9H	1E	11E	3R	10E	3E	12R
1H	11H	1R	12E	3H	10R	4R	12H	4H	9R
4E	11E	6E	8H	6R	10H	5H	10H	3R	8R
2R	7R	6H	9R	2E	9E	3H	9R	5H	10E
6H	12R	4R	10H	5R	11H	1R	11E	5E	8E
5R	10H	4H	7E	1R	7E	2H	9H	6H	11E
4H	7E	1E	11R	6E	11R	1H	8H	1H	10H
6E	12H	3H	11E	5E	9R	6E	11R	3H	7H
2E	8R	5R	7H	6H	12R	6R	12E	2R	11R
1E	10E	4E	12H	4R	7R	1E	11H	1R	12E
2H	12E	3R	8R	2R	8E	4E	7R	6R	8H
5H	9R	1H	12R	4H	12H	6H	8E	6E	9E
4R	7H	2R	8E	4E	9H	2E	9E	2H	7E
6R	10R	2E	10R	3R	8R	2R	10R	4E	7R
3E	9H	3E	10E	1H	7H	5E	7H	5R	11H
3H	8H	2H	9E	3E	12E	5R	8R	2E	12H
1R	11R	5H	7R	2H	8H	3E	7E	1E	10R
3R	8E	5E	11H	5H	10E	4H	12R	4R	9H

MS = Murashige y Skoog; B5 = Gamborg *et al.*; E = embrión; R = raíz; H = hipocotilo; 1=MS con 0.5 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN; 2=MS con 3.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN; 3=MS con 5.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN; 4=MS con 0.5 mg/l de ANA y 3.0 mg/l de KIN; 5=MS con 3.0 mg/l de ANA y 3.0 mg/l de KIN; 6=MS con 5.0 mg/l de ANA y 3 mg/l de KIN. 7=B5 con 0.1mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN; 8=B5 con 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN; 9=B5 con 1.0 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN; 10=B5 con 0.1 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de KIN; 11=B5 con 0.5 mg/l de 2,4-D con 1.0 mg/l de KIN; 12=B5 con 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de KIN.



6.2.1.G Manejo del experimento

6.2.1.G.a Preparación del medio

Los componentes del medio se prepararon en soluciones concentradas de concentración conocida para macroelementos, microelementos, soluciones de hierro, vitaminas, myo-inositol y reguladores del crecimiento. Los medios de cultivos se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C a 15 psi, ya esterilizado se agregó 15 ml del medio en cada caja de petrí previamente esterilizada.

6.2.1.G.b Obtención, preparación e inoculación de los explantes

La obtención y preparación del embrión se hizo seleccionando las semillas de frijol, que estuvieran libres de daño por plagas y sin mal formaciones, luego se lavaron con agua, después se esterilizaron con 1.1 % de hipoclorito de sodio durante 20 minutos sobre un agitador, en seguida se lavó el cloro con agua destilada por 4 veces, por último se pusieron las semillas en remojo durante 24 horas en un beaker con agua destilada. Al cabo de las 24 horas, los granos se volvieron a esterilizar con 1.1 % de hipoclorito de sodio, durante 20 minutos, luego se lavaron 4 veces con agua destilada y esterilizada. Estando las semillas limpias se procedió a extraer los embriones y se inocularon 5 explantes en cada caja de petrí. Todos estos procesos se realizaron en la cámara de flujo laminar.

Las raíces e hipocotilos se obtuvieron de semillas seleccionadas, se lavaron con agua, luego se esterilizaron con 1.1 % de hipoclorito de sodio durante 20 minutos sobre un agitador, posteriormente se lavaron 4 veces con agua destilada y esterilizada. Las semillas esterilizadas se pusieron a germinar en erlenmeyer de 250 ml que contenía 15 ml de agar debidamente esterilizado. Tres días después se cortaron los explantes y se inocularon sobre los medios de cultivo contenidos en las cajas de

petrí, en cada caja se colocaron cinco explantes, cada explante medía aproximadamente 10 mm, los procesos anteriores se hicieron en la cámara de flujo laminar. La superficie de trabajo se desinfectó con alcohol y los bisturíes y pinzas se flamearon en un mechero, cada vez que se tocaba un tejido diferente.

6.2.1.G.c Condiciones de cultivo

Los explantes de embrión, raíz e hipocotilo inoculados en los medios de inducción de callos se mantuvieron en un cuarto de incubación bajo un fotoperíodo de 18 horas luz y 6 horas de oscuridad. Se usaron lámparas fluorescentes de luz blanca que proporcionaron aproximadamente 2,500 lux y una temperatura de 25°C.

6.2.1.G.d Variables evaluadas

Los datos de las variables fueron anotados a los 15 días de cultivo, independientemente de cada medio basal. Las variables fueron las siguientes:

1. Callos inducidos. El conteo se hizo en los explantes que indujeron callos. Los explantes muertos o que sólo formaron raíces y brotes, no fueron incluidos.
2. Peso fresco de callos. Los callos que presentaron restos de tejidos iniciales y estructuras secundarias como raíces y brotes, fueron limpiados con bisturí y luego se pesaron.
3. Porcentaje de callos formados a partir de explantes de embrión, raíz e hipocotilo.
4. Consistencia de los callos a los 15 días de cultivo.

6.2.1.G.e Método de análisis

Los análisis estadísticos se efectuaron independientemente tanto para los medios de inducción de callo que contenía el medio basal de Murashige

Skoog como para los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg *et al.*

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) al número de callos inducidos y al peso fresco de los callos. Los datos fueron forzados a cumplir con los supuestos del ANDEVA mediante la transformación de la raíz cuadrada $Y = \sqrt{x + 1}$ en donde aparecían muchos ceros y $Y = \sqrt{x}$ cuando en "x" no habían ceros, luego se analizó la variable "Y". Los datos continuos del peso fresco no se les hizo la transformación.

Cuando se notaron diferencias significativas (*) y altamente significativas (**) fue necesario realizar pruebas de medias por el método de TUKEY, para cada factor o en la interacción de ambos.

Para la variable consistencia de los callos, se hizo un análisis mediante la prueba Q de Cochran, para lo cual los datos fueron clasificados en dos categorías así: 0 = callos compactos, fueron aquellos cuya textura de la masa callosa era firme, con células bien unidas entre sí y 1 = callos friables, los cuales tenían sus células espaciadas entre sí, mostrando una superficie no firme de la masa callosa. El análisis de esta variable se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{(K-1) \left[k \sum_{j=1}^K G_j^2 - \left(\sum_{J=1}^K G \right)^2 \right]}{K \sum_{i=1}^N L_i - \sum_{i=1}^N L_i^2}$$

Donde:

- Q = Prueba Q de Cochran
- N = Número de filas
- K = Número de columnas
- G_j = Suma de éxitos en cada tratamiento
- L_i = Suma de éxitos en cada grupo

Con esta fórmula se determinó el valor de Q. La significancia del valor observado se determinó con la función de Ji-cuadrado, con (k-1) grados de libertad. Si la probabilidad asociada con el valor obtenido de

Q es igual o menor que el nivel de significación, se rechaza la hipótesis nula. (H₀: probabilidad de ocurrencia, igual en todos los tratamientos).

Los porcentajes se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$PCF = \frac{\text{Número de callos formados a partir de embriones, raíces e hipocotilo.}}{\text{Total de explantes de embriones, raíces e hipocotilos.}} \times 100$$

Los porcentajes fueron graficados usando los datos no transformados. Se graficaron las medias de los datos transformados y no transformados que se usaron para la prueba de Tukey.

6.2.2 Fase de regeneración de plantas

Los factores que se estudiaron fueron: medios de regeneración y callos derivados de los explantes de embrión (E), raíz (R) e hipocotilo.

6.2.2.A Evaluación de medios de regeneración

Se utilizaron los callos producidos en la fase de inducción de callo. Los inóculos fueron debidamente marcados de acuerdo al medio donde se desarrolló y el tipo de explante que le dió origen.

Los callos derivados de los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog (MS) fueron inoculados en los medios de regeneración que contenía el medio basal Murashige y Skoog y los callos originados de los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al (B5) fueron inoculados en los medios de regeneración que contenían los medios basales: Murashige y Skoog (MS), Gamborg et al (B5), Murashige y Skoog más las vitaminas del medio Gamborg et al (MS5) y el medio designado como RB.

6.2.2.B Medios de cultivo para la regeneración

Los medios basales utilizados fueron los siguientes: Murashige y Skoog (MS), Gamborg et al (B5), Murashige y Skoog más las vitaminas del medio Gamborg et al (MS5) y el medio designado como RB. Sus concentraciones se muestran en el cuadro 18 "A" y las combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento se presentan en los cuadros 5 y 6.

Los medios de regeneración del cuadro 5 sirvieron para evaluar el la respuesta de los callos producidos en el medio basal Murashige y Skoog de la fase de inducción de callo, en cuanto a la regeneración de plantas.

Cuadro 5 Medio basal Murashige-Skoog, combinación de reguladores del crecimiento, que se evaluaron en la regeneración de plantas, de callos originados sobre el medio basal Murashige y Skoog.

Medio basal	Combinación y concentración de los reguladores del crecimiento (mg/l)		
	Sin reguladores del crecimiento		
Murashige	AIA		KIN
	8.0		0.5
y	ANA		BAP
	1.0		0.5
Skoog	AIA	ANA	KIN
	1.9	1.0	0.19
	Estracto de 1/4 de semilla hervida de frijol variedad Quinack Che/ml.		
	AIA	BAP	GA ₃
	8.0	0.5	0.1

AIA = ácido indolacético, KIN = N⁶furfuril aminopurina (quinetina o cinetina), BA = bencil aminopurina, GA₃ = ácido giberélico. ANA= ácido naftalenacético.

Los medios de regeneración del cuadro 6, se usaron para evaluar la respuesta de los callos producidos en los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al, fase de inducción de callo.

Cuadro 6 Medios basales, combinación y concentración de reguladores del crecimiento que se evaluaron en la regeneración de plantas, de callos producidos sobre el medio basal Gamborg et al.

Medio basal	Combinación y concentración de hormonas (mg/l)		
	RB	PIC 1.0	BA 4.0
B5	AIA 2.0	BAP 1.0	GA ₃ 0.1
MS	AIA 1.96	KIN 0.19	ANA 1.0
	extracto de 1/4 de semilla cruda de frijol Quinack Che/ml		
MS5	ANA 0.18		BA 2.25
MS5		BA 2.25	

PIC = Picloram, BA = 6-bencilaminopurina o benciladenina, IBA = ácido indolbutírico, AIA = Acido indolacético, KIN = quinetina, ANA = Acido naftalenacético. RB = medio basal, B5 = Gamborg et al., MS = Murashige-Skoog y MS5 = Murashige-Skoog más vitaminas de B5.

6.2.2.C Callos producidos en la primera fase

Estos fueron los callos originados de los tejidos de embriones (E), raíces (R) e hipocotilos (H), producidos sobre los medios basales Murashige-Skoog y Gamborg et al. más 6 combinaciones de reguladores del crecimiento de cada medio basal.

6.2.2.D Diseño experimental

Se usó un diseño experimental de bloques al azar con estructura bifactorial, para el primer subcultivo realizado (figura 1). Uno de los factores estuvo constituido por los medios de regeneración, cuadro 5 y 6 (factor D=5) y el otro factor fueron los callos originados en la primera fase en los medios basales Murashige-Skoog y Gamborg et al. (factor F=6), los cuales representan 30 tratamientos para los callos originados de embrión, 30 para los derivados de raíz y 30 para los producidos de

hipocotilo, en el medio basal Murashige-Skoog. Los mismos 30
tratamientos para los callos originados de explantes de embrión, 30 para
los obtenidos de raíz y 30 para los inducidos en explantes de hipocotilo
sobre el medio basal Gamborg et al, haciendo un total de 90 tratamientos
para cada medio basal.

Para los callos derivados de cada uno de los explantes inducidos en el
medio basal Murashige y Skoog y en el medio basal Gamborg et al se
planteó un diseño experimental.

6.2.2.E Unidad experimental

La unidad experimental consistió de un frasco de 150 ml de capacidad
conteniendo 15 ml del medio de cultivo y tres callos de cada tratamiento.
Fueron 30 tratamientos con tres repeticiones dando 90 unidades
experimentales para los callos derivados de embriones, 90 para las raíces
y 90 para los originados de hipocotilos. Los tres ensayos sumaron 270
unidades experimentales para el primer grupo (MS). Para el segundo grupo
(B5) fueron también 270 unidades experimentales.

6.2.2.F Modelo estadístico

El modelo estadístico utilizado fue igual al de la primera fase.

6.2.2.G Distribución de los tratamientos

Los medios de regeneración y callos originados de embrión, raíz e
hipocotilo fueron sometidos en un arreglo combinatorio como se muestra en
los cuadros 7 y 8.

Cuadro 7 Arreglo combinatorio de los medios de regeneración y tipos de callo derivados de 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog.

Callo originado de embrión en ANA/KIN mg/l		Callo originado de raíz en ANA/KIN mg/l		Callo originado de hipocotilo en ANA/KIN. mg/l	
	ANA/KIN		ANA/KIN		ANA/KIN
V	0.5/0.5	V	0.5/0.5	V	0.5/0.5
V	3.0/0.5	V	3.0/0.5	V	3.0/0.5
V	5.0/0.5	V	5.0/0.5	V	5.0/0.5
V	0.5/3.0	V	0.5/3.0	V	0.5/3.0
V	3.0/3.0	V	3.0/3.0	V	3.0/3.0
V	5.0/3.0	V	5.0/3.0	V	5.0/3.0
W	0.5/0.5	W	0.5/0.5	W	0.5/0.5
W	3.0/0.5	W	3.0/0.5	W	3.0/0.5
W	5.0/0.5	W	5.0/0.5	W	5.0/0.5
W	0.5/3.0	W	0.5/3.0	W	0.5/3.0
W	3.0/3.0	W	3.0/3.0	W	3.0/3.0
W	5.0/3.0	W	5.0/3.0	W	5.0/3.0
X	0.5/0.5	X	0.5/0.5	X	0.5/0.5
X	3.0/0.5	X	3.0/0.5	X	3.0/0.5
X	5.0/0.5	X	5.0/0.5	X	5.0/0.5
X	0.5/3.0	X	0.5/3.0	X	0.5/3.0
X	3.0/3.0	X	3.0/3.0	X	3.0/3.0
X	5.0/3.0	X	5.0/3.0	X	5.0/3.0
Y	0.5/0.5	Y	0.5/0.5	Y	0.5/0.5
Y	3.0/0.5	Y	3.0/0.5	Y	3.0/0.5
Y	5.0/0.5	Y	5.0/0.5	Y	5.0/0.5
Y	0.5/3.0	Y	0.5/3.0	Y	0.5/3.0
Y	3.0/3.0	Y	3.0/3.0	Y	3.0/3.0
Y	5.0/3.0	Y	5.0/3.0	Y	5.0/3.0
Z	0.5/0.5	Z	0.5/0.5	Z	0.5/0.5
Z	3.0/0.5	Z	3.0/0.5	Z	3.0/0.5
Z	5.0/0.5	Z	5.0/0.5	Z	5.0/0.5
Z	0.5/3.0	Z	0.5/3.0	Z	0.5/3.0
Z	3.0/3.0	Z	3.0/3.0	Z	3.0/3.0
Z	5.0/3.0	Z	5.0/3.0	Z	5.0/3.0

ANA= Acido naftalenacético, KIN= kinetina (N⁶furfuril aminopurina).
V=MS sin reguladores del crecimiento; W=MS con 8.0 mg/l de Acido indolacético (AIA) y 0.5 mg/l de kinetina (KIN); X=MS 1.0 mg/l de Acido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg/l Bencil aminopurina; Y=MS con 1.9 mg/l de Acido indolacético; 1.0 mg/l Acido naftalenacético, 0.19 mg/l de kinetina y extracto de 1/4 de semilla hervida de frijol variedad Quinack Che/ml.
Z=MS con 8.0 mg/l Acido indolacético, 0.5 mg/l de Bencil aminopurina y 0.1 mg/l de Acido giberélico.

Cuadro 8 Arreglo combinatorio de los medios de regeneración y tipos de callo derivados de 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al.

Callo originado de embrión en 2,4-D/KIN mg/l	Callo originado de raíz en 2,4-D/KIN mg/l	Callo originado de hipocotilo en 2,4-D/KIN mg/l
2,4-D/KIN	2,4-D/KIN	2,4-D/KIN
V 0.1/0.5	V 0.1/0.5	V 0.1/0.5
V 0.5/0.5	V 0.5/0.5	V 0.5/0.5
V 1.0/0.5	V 1.0/0.5	V 1.0/0.5
V 0.1/1.0	V 0.1/1.0	V 0.1/1.0
V 0.5/1.0	V 0.5/1.0	V 0.5/1.0
V 1.0/1.0	V 1.0/1.0	V 1.0/1.0
W 0.1/0.5	W 0.1/0.5	W 0.1/0.5
W 0.5/0.5	W 0.5/0.5	W 0.5/0.5
W 1.0/0.5	W 1.0/0.5	W 1.0/0.5
W 0.1/1.0	W 0.1/1.0	W 0.1/1.0
W 0.5/1.0	W 0.5/1.0	W 0.5/1.0
W 1.0/1.0	W 1.0/1.0	W 1.0/1.0
X 0.1/0.5	X 0.1/0.5	X 0.1/0.5
X 0.5/0.5	X 0.5/0.5	X 0.5/0.5
X 1.0/0.5	X 1.0/0.5	X 1.0/0.5
X 0.1/1.0	X 0.1/1.0	X 0.1/1.0
X 0.5/1.0	X 0.5/1.0	X 0.5/1.0
X 1.0/1.0	X 1.0/1.0	X 1.0/1.0
Y 0.1/0.5	Y 0.1/0.5	Y 0.1/0.5
Y 0.5/0.5	Y 0.5/0.5	Y 0.5/0.5
Y 1.0/0.5	Y 1.0/0.5	Y 1.0/0.5
Y 0.1/1.0	Y 0.1/1.0	Y 0.1/1.0
Y 0.5/1.0	Y 0.5/1.0	Y 0.5/1.0
Y 1.0/1.0	Y 1.0/1.0	Y 1.0/1.0
Z 0.1/0.5	Z 0.1/0.5	Z 0.1/0.5
Z 0.5/0.5	Z 0.5/0.5	Z 0.5/0.5
Z 1.0/0.5	Z 1.0/0.5	Z 1.0/0.5
Z 0.1/1.0	Z 0.1/1.0	Z 0.1/1.0
Z 0.5/1.0	Z 0.5/1.0	Z 0.5/1.0
Z 1.0/1.0	Z 1.0/1.0	Z 1.0/1.0

2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético, KIN = kinetina (N⁶furfuril aminopurina)
V=Medio basal RB con 1.0 mg/l de Picloram, 4.0 mg/l de Bencilaminopurina
y 0.1 mg/l de Acido indolbutírico.

W= Gamborg et al con 2.0 mg/l de Acido indolacético; 1.0 mg/l de Bencil
aminopurina y 0.1 mg/l de Acido giberélico.

X= MS con 1.96 mg/l de Acido indolacético, 0.19 mg/l de kinetina y 1.0
mg/l de Acido naftalenacético y extracto de 1/4 de semilla cruda de frijo
variedad Quinack Che.

Y= MS y vitaminas de B5 con 0.18 mg/l de Acido naftalenacético, 2.25 mg/l
de Bencil adenina.

Z= MS y vitaminas de B5 con 2.25 mg/l de Bencil adenina.

Cada ensayo fue establecido con base a una aleatorización con el fin de evitar el efecto de luz durante la incubación. Para la distribución se siguió el mismo modelo utilizado en la fase de inducción de callos, obsérvese el cuadro 4.

6.2.2.H Manejo del experimento

Preparación del medio: los ingredientes se manejaron de igual forma que la hecha en la fase de inducción de callos, a excepción del medio que contenía 1.9 mg/l de ácido indolacético, 1.0 mg/l de ácido naftalenacético y 0.19 mg/l de cinetina más 1/4 de semilla de frijol/ml del primer grupo, (medios de inducción de callo sobre el medio basal Murashige y Skoog), en la cual las semillas de frijol se pusieron en un erlenmeyer de 250 ml se agregó 100 ml de agua se hirvió durante 5 minutos, luego se retiró de la estufa. El extracto obtenido fue agregado al medio de regeneración. En el segundo grupo (medios de inducción sobre el medio basal Gamborg et al), el medio que contenía 1.96 mg/l de ácido indolacético, 0.19 mg/l de cinetina, 1.0 mg/l de ácido naftalenacético y extracto de 1/4 de semilla cruda de frijol Quinack Che/ml; el extracto se preparó macerando los granos de frijol en un mortero, para lo cual se echaron 60 ml de agua destilada para remojar los granos, ya macerados se coló en un paño limpio, obteniéndose el extracto, el cual fue agregado al medio más los reguladores del crecimiento, se ajustó el pH a 5.75, se agregó el agar y por último fue autoclaveado.

Obtención e inoculación de los callos: los callos que tenían raíces y brotes se limpiaron con bisturíes y se inocularon sobre los medios de regeneración, los frascos se identificaron de acuerdo al medio de inducción de callo y el explante que lo originó en la fase de inducción de callo.

Condiciones de cultivo: se observaron las mismas condiciones que en la fase de inducción de callo.

Variable evaluada:

Porcentaje de callos con puntos verdes (%CPV)

6.2.2.I Método de análisis

Debido a que el número de puntos de regeneración fue muy bajo no se le hizo análisis de varianza, no obstante haberlo establecido en un diseño experimental. El porcentaje fue obtenido de la siguiente fórmula:

$$\%CPV = \frac{\text{Número de callos con puntos verdes de}}{\text{Número de callos inoculados}} \times 100$$

6.2.2.J Subcultivos

Debido a que se observaron puntos verdes sobre el medio de regeneración que contenía 1.0 mg/l de ácido naftalenacético y 0.5 mg/l de bencil aminopurina en los callos provenientes de embriones, producidos en la primera fase sobre el medio basal Murashige-Skoog y 6 combinaciones de reguladores del crecimiento. El segundo y tercer subcultivo se realizaron con el fin de desarrollar los puntos verdes sobre los siguientes medios: en el segundo subcultivo (figura 1) se utilizaron los reguladores del crecimiento ácido naftalenacético y bencil aminopurina, sobre el medio basal Murashige y Skoog, las concentraciones evaluadas estuvieron en un rango de 0 a 2 mg/l, que contenía las concentraciones que originaron los puntos verdes (1.0 y 0.5 mg/l de ácido naftalenacético y bencil amino purina). El tercer subcultivo (figura 1) fue establecido sobre el medio basal Murashige y Skoog sin reguladores del crecimiento.

Los puntos verdes se cultivaron en tubos de ensayo de 16x25 mm conteniendo 10 ml del medio y un centro de regeneración en cada tubo.

El segundo y tercer subcultivo no se establecieron sobre la base de un diseño experimental debido a la poca cantidad de puntos verdes.

Secuencia de las dos fases de la investigación, figura 1.

FASE DE INDUCCION DE CALLO
(15 días)

Medio basal
Murashige
Skoog
más 6 combinaciones
de reguladores del
crecimiento

Medio basal
Gamborg
et al
más 6 combinaciones
de reguladores del
crecimiento

FASE DE REGENERACION DE PLANTAS

Primer grupo (MS)
medios de regeneración
cuadro 5
Presentó puntos verdes

Segundo grupo (B5)
medios de regeneración
cuadro 6
no presentó puntos verdes

Primer Subcultivo

Primer subcultivo

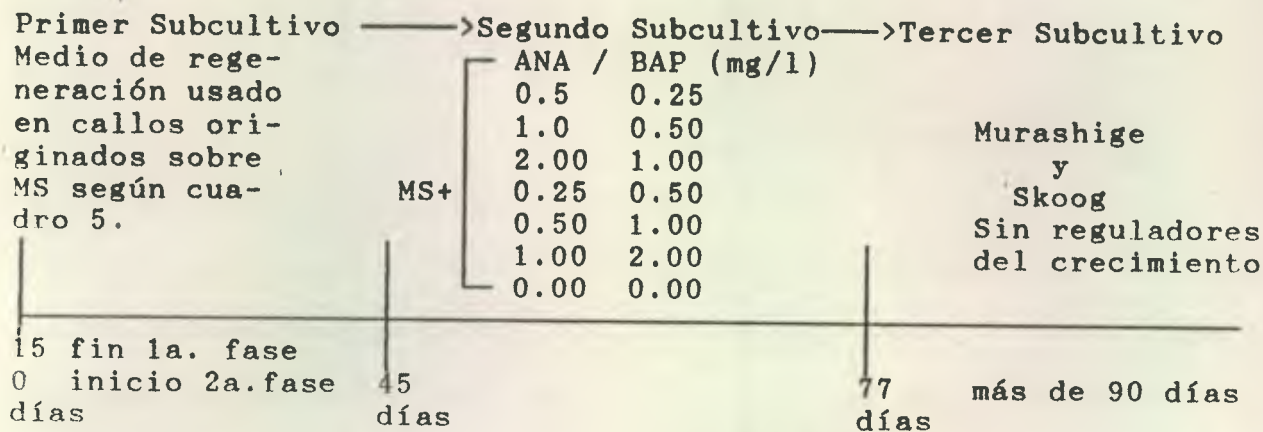


Figura 1 Secuencia de la fase de inducción de callo en los medios de inducción de callo que contenían los medios basales Murashige-Skoog y Gamborg et al y la fase de regeneración de plantas.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Resultados de la inducción de callo en los medios que contenía el medio basal Murashige y Skoog.

7.1.1 Inducción de callo

Todos los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog (MS), indujeron callo en los explantes.

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencia significativa en la inducción de callo. La mayor cantidad de callos se produjo utilizando el hipocotilo como explante en un medio que contenía 5.0 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg/l de N⁶furfuril aminopurina (KIN), la menor cantidad de callos fue producida con el embrión como explante en un medio que contenía 0.5 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN. En general la mayor cantidad de callos se obtuvo cuando se utilizó como explante hipocotilo o raíz y la menor cantidad cuando se utilizó embrión. El cuadro 9 muestra el análisis de varianza y el cuadro 10 los resultados obtenidos con los diferentes explantes y medios de inducción de callo.

Cuadro 9 Análisis de varianza del número de callos, empleando 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.	
					0.05	0.01
BLOQUE	4	0.242249				
TRATAM	17	3.256378	0.192	4.021	1.79	2.27 **
A	2	1.261322	0.631	13.239	3.14	4.95 **
B	5	0.624176	0.125	2.621	2.36	3.32 *
AB	10	1.370880	0.137	2.878	1.98	2.60 *
ERROR	68	3.239258	0.048			
TOTAL	89	6.737885				

C.V. = 10.4947, A = explantes, B = medios de inducción de callo. AB = interacción explantes x medios de inducción de callo.

Cuadro 10 Prueba de Tukey para la interacción explantes x medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog, con un nivel de significancia del 5 %.

Tratamiento ANA/KIN (mg/l)	Explante	Media producción callos \sqrt{x}		producción de callo %
5.0/0.5	Hipocotilo	2.236	A	100.00
0.5/0.5	Raíz	2.189	A	97.89
0.5/3.0	Raíz	2.189	A	97.89
5.0/3.0	Raíz	2.189	A	97.89
3.0/0.5	Hipocotilo	2.189	A	97.89
3.0/3.0	Hipocotilo	2.189	A	97.89
5.0/3.0	Hipocotilo	2.189	A	97.89
5.0/0.5	Embrión	2.142	A	95.79
5.0/3.0	Embrión	2.142	A	95.79
3.0/0.5	Raíz	2.142	A	95.79
3.0/3.0	Raíz	2.142	A	95.79
0.5/3.0	Hipocotilo	2.142	A	95.79
0.5/0.5	Hipocotilo	2.135	A	95.48
3.0/3.0	Embrión	2.088	A	93.38
5.0/0.5	Raíz	2.024	A	90.51
3.0/0.5	Embrión	1.841	A B	82.33
0.5/3.0	Embrión	1.829	A B	81.79
0.5/0.5	Embrión	1.439	B	64.35

Los tratamientos con igual letra son estadísticamente iguales. ANA= Acido naftalenacético, KIN= kinetina (N°furfurilaminopurina).

El explante de hipocotilo alcanzó mayor rendimiento (95.3 %) de callos, pero muchos de estos callos se formaron a partir de las raíces secundarias, mientras que algunos de los tejidos originales aún permanecían sin inducir callo. La formación de callo en el explante de hipocotilo se inició de la periferia hacia el centro del tejido y en la parte cortada en contacto con el medio de inducción. La tendencia a formar raíces secundarias en este explante se observó desde los 5 días de cultivo, a los 15 días, todos los explantes presentaban estas estructuras, el desarrollo de raíces secundarias en el explante de hipocotilo influyó a que fuera más tardía para la formación del callo.

El explante de embrión rindió el menor porcentaje (76 %) de callos, esto fue debido a que este explante produjera también el crecimiento de brotes y el desarrollo de raíces secundarias a partir de los explantes, pero las raíces secundarias fueron más delgadas que los producidos en el

hipocotilo, el callo en este explante empezó a desarrollarse de la radícula hacia la plúmula. En cuanto a la producción de raíces secundarias en explantes de raíces han sido reportados con anterioridad para otras variedades de frijol (16).

El explante de raíz rindió 92.7 % de callo, la inducción de callo se vió desde los 5 días en toda la superficie del explante, principalmente la parte en contacto con el medio de cultivo. El explante de raíz fue el más precoz en la formación del callo, con menos formación de raíces secundarias. Por estas características los tejidos de raíces ofrecen estas ventajas sobre los otros explantes. La figura 2 muestra los porcentajes de producción de callo (datos no transformados) por cada uno de los explantes y combinaciones de reguladores del crecimiento.

El efecto del medio basal Murashige y Skoog suplementado con la auxina ANA sólo o combinada con otras citoquininas en cuanto a la inducción de callo en diferentes explantes de frijol fue reportado anteriormente para otras variedades, lo cual nuestros resultados coinciden en relación al resultado en la inducción de callo (16, 20, 28, 25, y 26).

Una alta frecuencia en la formación de callo en el cultivar Riñón morado así como la inducción de callos grandes en explantes de hipocotilo fue logrado por Ruíz y Peláez (26). Estos resultados son similares a los efectos observados en la variedad Quinack Ché.

Medios de inducción callo

ANA KIN (mg/l)

- 1) 0.5 0.5
- 2) 3.0 0.5
- 3) 5.0 0.5
- 4) 0.5 3.0
- 5) 3.0 3.0
- 6) 5.0 3.0

Tipos de Explantes

E= embrión

R= raíz

H= hipocotilo

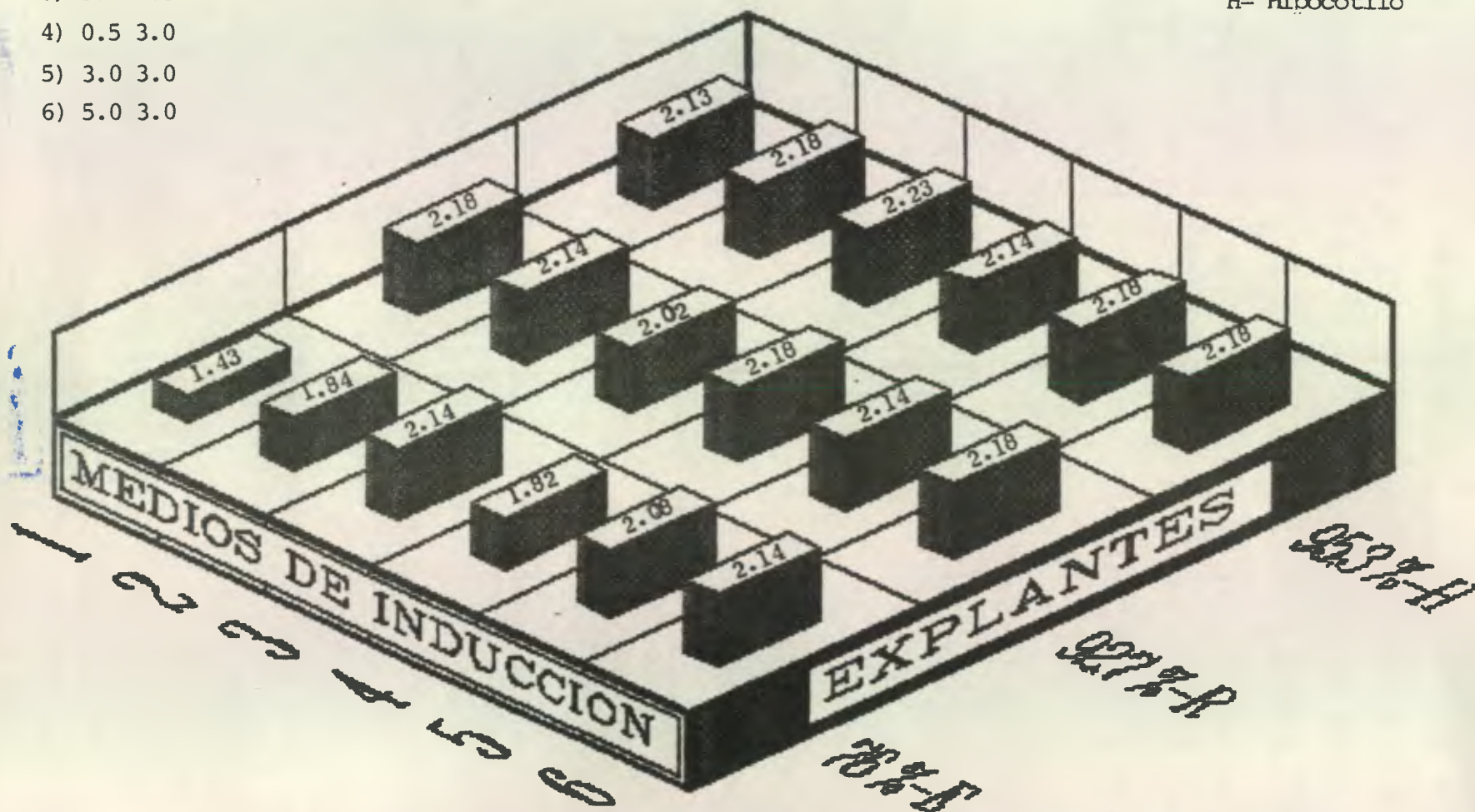


Figura 2 Inducción de callo, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog.

7.1.2 Peso fresco:

Todos los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog (MS), indujeron callo con pesos relativamente altos. Los resultados del análisis de varianza muestran diferencia significativa en el peso fresco, para los factores explantes y medios de inducción de callo. Los mayores pesos fresco se obtuvieron utilizando el embrión como explante y los menores pesos fresco fue producido en explantes de raíces. Mientras que en los medios de inducción, el mayor peso fresco se alcanzó en un medio que contenía 5.0 mg/l de ANA y 3.0 mg/l de KIN, en tanto que el menor peso fresco fue obtenido en un medio que contenía 0.5 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN. Resultados análogos en cuanto a la eficiencia del medio basal Murashige y Skoog más los reguladores del crecimiento ANA y KIN para la producción de callos con pesos fresco altos han sido reportados anteriormente en otras investigaciones (20, 28).

Los callos originados de explantes de embrión desarrollaron raíces secundarias y crecimiento de brotes. Tanto las raíces secundarias como los brotes, formaron callos, aunque no totalmente, sí influyeron en lograr mayor peso fresco (promedio 1.63 g) en los callos derivados de tejidos de embrión. Mientras que los callos originados de explantes de raíces tenían poca cantidad de raíces secundarias y de formas delgadas, las cuales fueron quitados con facilidad al pesar los callos. El tamaño pequeño de estos callos influyó en el menor peso promedio de 1.02 g alcanzados por los callos originados de explantes de raíz.

El cuadro 11 muestra el análisis de varianza y los cuadros 12 y 13 el comportamiento en el peso fresco de los callos por explante y en los medios de inducción, respectivamente. La Figura 3, presenta el comportamiento en el peso de los callos logrados en los medios de inducción de callos a partir de explantes de embrión, raíz e hipocotilo.

Cuadro 11 Análisis de varianza para el peso fresco de callos a los 15 días de cultivo, empleando 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio Murashige-Skoog.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.	
					0.05	0.01
BLOQUE	4	10.400210				
TRATAM	17	33.718290	1.983	2.083	1.79	2.27 *
A	2	6.418625	3.209	3.370	3.14	4.95 *
B	5	11.973770	2.395	2.515	2.36	3.32 *
AB	10	15.325900	1.533	1.609	1.98	2.60
ERROR	68	64.751030	0.952			
TOTAL	89	108.869500				

C.V. = 70.0125 %, A = explante, B = medios de inducción de callo

Cuadro 12 Prueba de Tukey para el peso fresco de los callos en los tratamientos explantes, sobre el medio basal Murashige y Skoog, con un nivel de significancia del 5 %.

Tratamiento	Media del peso fresco (gr)	Presentación
Embrión	1.634	A
Hipocotilo	1.526	B
Raíz	1.021	C

Cuadro 13 Prueba de Tukey para el peso fresco en los tratamientos de los medios de inducción de callo sobre el medio basal Murashige y Skoog, con un nivel de significancia del 5 %.

Tratamiento ANA/KIN (mg/l)	Media del peso fresco (gr)	Presentación
5.0/3.0	1.937	A
3.0/3.0	1.755	B
5.0/0.5	1.378	C
3.0/0.5	1.358	C
0.5/3.0	1.025	D
0.5/0.5	0.909	F

Los tratamientos con igual letra son estadísticamente iguales.

Existe alto coeficiente de variación en los valores de la inducción de callo, lo cual es normal en estudios de inducción de callo, esto es debido a que los tejidos de tipo calloso generalmente son heterogéneos (12).

Medios de inducción de callo

	ANA	KIN (mg/l)
1)	0.5	0.5
2)	3.0	0.5
3)	5.0	0.5
4)	0.5	3.0
5)	3.0	3.0
6)	5.0	3.0

Tipos de explantes

- E = embrión
- R = raíz
- H = hipocotilo

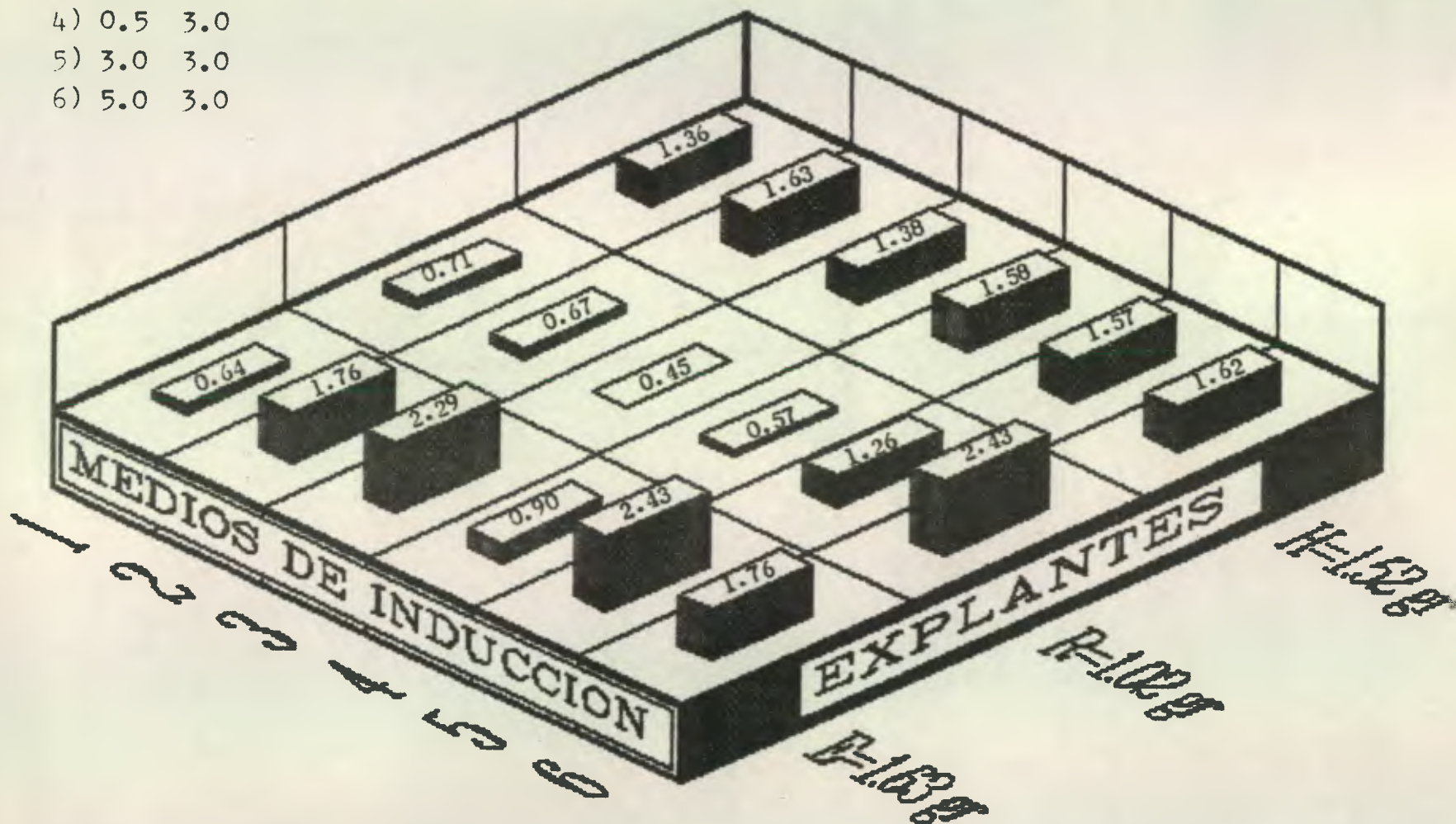


Figura 3 Peso fresco (gr) de los callos, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog.

7.1.3 Consistencia de los callos

A los 15 días de cultivo, la consistencia de los callos derivados de los tres tipos de explantes evaluados sobre los seis medios de inducción de callo mostraron textura compacta, únicamente se exceptúa la interacción del embrión con el medio de cultivo con 0.5 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN, el cual indujo callo friable. Esta diferencia significativa se determinó al aplicar la prueba Q de Cochran. A los 5 días de cultivo los callos tenían aspecto friable, de color blanco como escarcha y pequeños, pero a los 15 días, los callos presentaban coloración café claro y grandes con un peso promedio de 1.38 gr. La respuesta en el comportamiento morfológico de los callos en diferentes medios provenientes de explantes de raíces, hipocotilo y cotiledones, han sido reportados anteriormente en otros cultivares de frijol (8, 16, 28), lo cual concuerdan con los resultados obtenidos. En nuestro estudio los callos alcanzaron su máximo tamaño entre los 10 y 15 días de cultivo. Pero Liau, Boll y Ramos (16, 23) reportaron un máximo crecimiento en los callos entre los 8, 12 y 17 días de cultivo.

Las relaciones del efecto del medio basal MS más seis combinaciones de ANA y KIN a la inducción de callo, peso fresco y consistencia de los callos indica que a una alta concentración del ANA (5.0 mg/l) sobre la KIN (0.5 mg/l) fue la que mostró mayor eficiencia a la inducción de callo; produjo los callos con mayores pesos fresco y de consistencia compacta. Mientras que las bajas concentraciones de ambos reguladores (0.5 mg/l de ANA y KIN) exhibieron bajo rendimiento a la inducción de callo, originaron callos con menores pesos fresco y callos de consistencia friables en el embrión como explante.

Los explantes de hipocotilo alcanzaron el mayor porcentaje, 95.3 % de callos formados, sin embargo no lograron los mayores pesos fresco, en cambio los embriones, a pesar de rendir el menor porcentaje 76 % de

callos inducidos, sí produjeron callos con mayores pesos fresco. En general todos los callos fueron compactos, grandes y con buen peso fresco, lo cual coincide con reportes anteriores (16, 23).

7.2 Resultados de la inducción de callo en los medios que contenía el medio basal Gamborg et al

7.2.1 Inducción de callo

Todos los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al (B5), indujeron callo en los tres explantes evaluados.

Los resultados del análisis de varianza exhiben diferencia altamente significativa en la inducción de callo. El mayor número de callos se produjo empleando la raíz como explante en los medios que contenían 0.1 mg/l de 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.5 mg/l de kinetina (KIN) y el medio que contenía 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l KIN. La menor cantidad de callos fue producida con el hipocotilo como explante en un medio que contenía 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de KIN.

En general, los mayores porcentajes 83 % y 82.7 % de callos se obtuvieron cuando se emplearon como explante embrión y raíz respectivamente y la menor cantidad 72 % cuando se utilizó hipocotilo como explante, figura 4.

El Cuadro 14 muestra el análisis de varianza y el Cuadro 15 los resultados obtenidos con los tres explantes y medios de inducción de callo.

Cuadro 14 Análisis de varianza del número total de callos formados a los 15 días de cultivo, empleando 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.			
					0.05	0.01		
BLOQUE	4	0.246582						
TRATAM	17	6.678803	0.393	6.206	1.79	2.27	**	
A	2	0.516968	0.258	4.083	3.14	4.95	*	
B	5	2.811432	0.562	8.882	2.36	3.32	**	
AB	10	3.350403	0.335	5.292	1.98	2.60	**	
ERROR	68	4.305054	0.063					
TOTAL	89	11.230440						

C.V. = 11.4086, A = explantes, B = medios de inducción de callo, AB = interacción explantes x medios de inducción de callo.

Cuadro 15 Prueba de Tukey para la interacción explantes x medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al, con un nivel de significancia del 5 %.

Tratamiento 2,4-D/KIN (mg/l)	Explante	Media producción callo $\sqrt{x + 1}$		producción callo %
0.1/0.5	Raíz	2.449	A	100.00
0.5/0.5	Raíz	2.449	A	100.00
0.1/0.5	Embrión	2.407	B	98.28
0.5/0.5	Hipocotilo	2.407	B	98.28
0.5/0.5	Embrión	2.364	C	96.52
1.0/1.0	Embrión	2.364	C	96.52
1.0/0.5	Hipocotilo	2.364	C	96.52
0.1/1.0	Raíz	2.317	D	94.61
1.0/0.5	Embrión	2.274	E	92.85
0.1/0.5	Hipocotilo	2.274	E	92.85
0.5/1.0	Hipocotilo	2.221	F	90.69
1.0/0.5	Raíz	2.199	F	89.79
0.1/1.0	Raíz	2.094	G	85.50
0.5/1.0	Embrión	2.084	G H	85.09
0.5/1.0	Raíz	2.077	G H	84.81
0.1/1.0	Embrión	2.067	G H	84.40
1.0/1.0	Raíz	2.056	H	83.95
1.0/1.0	Hipocotilo	1.229	I	50.18

Tratamientos con igual letra son estadísticamente iguales.
2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético, KIN = Quinetina.

Los efectos del medio basal Gamborg et al suplementado con 2,4-D, sólo o combinado con otras citoquininas, ya han sido reportados para algunas variedades de frijol (23). La variedad Quinack Ché se comportó diferente en este medio comparado con los efectos obtenidos en el medio basal M3 más los reguladores del crecimiento ANA y KIN. Se induce que genéticamente la variedad se manifiesta ante determinado medio de cultivo, lo mismo ocurrió con los explantes, los cuales tuvieron comportamientos diferentes a la inducción de callo.

El regulador de crecimiento 2,4-D en el medio, favoreció eficientemente a la formación de callo, resultados similares han sido reportados anteriormente en otros estudios (25, 26).

Una baja inducción de callo en el medio basal B5 estuvo influenciado por una alta producción de raíces en los explantes derivados de hipocotilo. En los explantes de embriones, esta condición no afectó la

formación de callo. Por otro lado el crecimiento de brotes en este explante tampoco influenció la inducción de callo. Los explantes de raíces no fueron afectados en la inducción de callo, cuando los tejidos produjeron raíces secundarias.

Medios de inducción de callo

	2,4-D	KIN (mg/l)
7)	0.1	0.5
8)	0.5	0.5
9)	1.0	0.5
10)	0.1	1.0
11)	0.5	1.0
12)	1.0	1.0

Tipos de explantes

- E = embrión
- R = raíz
- H = hipocotilo

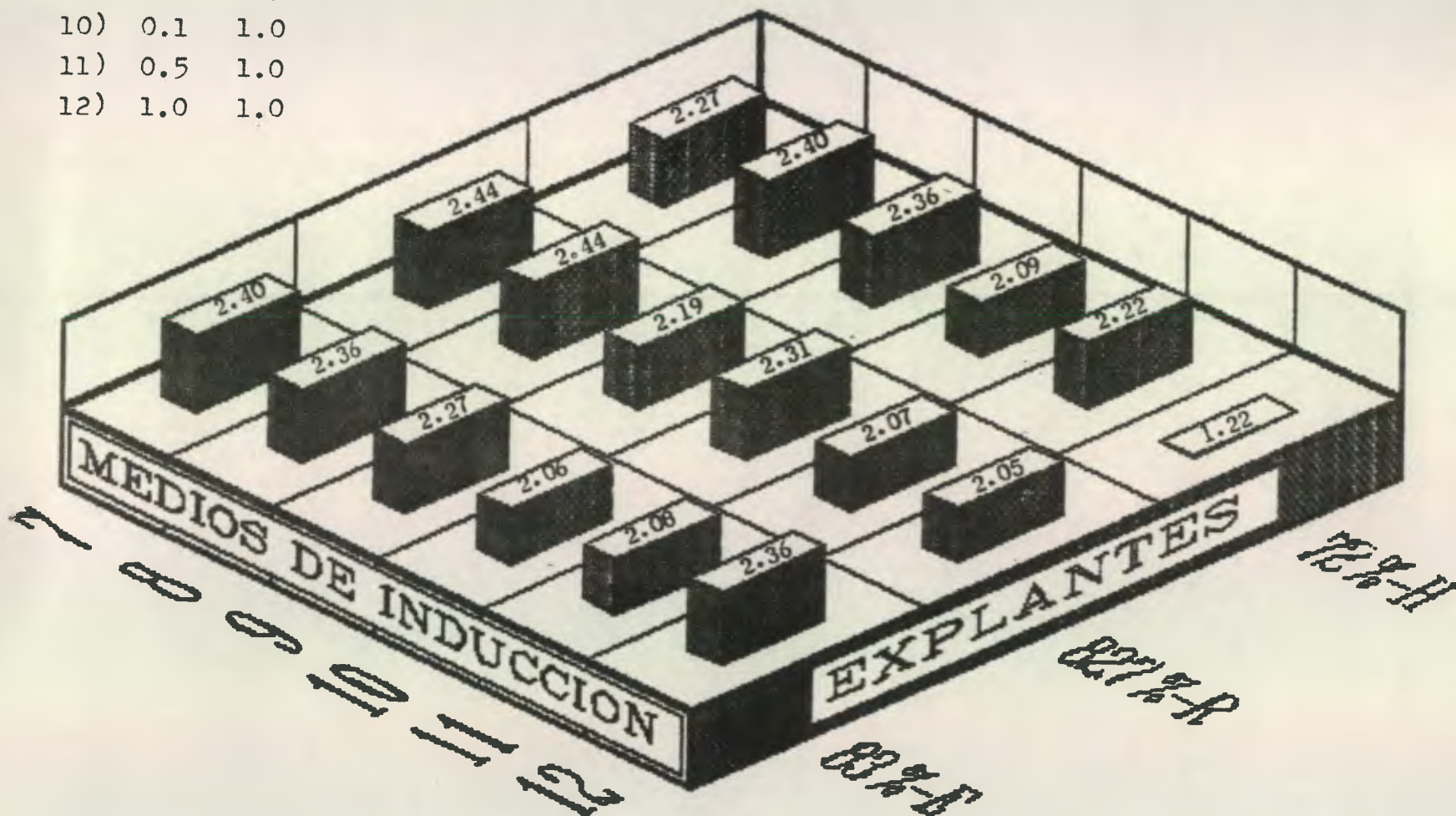


Figura 4 Inducción de callo, empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al.

7.2.2 Peso fresco

Todos los medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al (B5), indujeron callos generalmente pequeños.

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencia altamente significativa en el peso fresco. El mayor peso fresco se produjo empleando la raíz como explante en los medios que contenían 0.1 mg/l de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.5 mg/l de N⁶furfuril aminopurina (KIN); 0.5 mg/ de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN y 0.1 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de KIN. El menor peso fresco también fue producido en los tejidos de raíz como explante, pero en los medios que contenía 1.0 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN. En general se produjeron callos pequeños, con un peso promedio de 0.29 g, en los medios de inducción de callo que contenían el medio basal Gamborg et al. El efecto del 2,4-D sólo o en la presencia de otras citoquininas produjeron callos pequeños (26), esto coincide con nuestras observaciones, aunque Mok (20) y Crocomo et al (10) lograron callos grandes.

Los explantes de raíces produjeron callos con mayor peso fresco (promedio de 0.44 g) y los hipocotilos indujeron los callos con menos peso fresco, 0.17 g promedio.

El Cuadro 16, muestra el análisis de varianza y el Cuadro 17 los resultados obtenidos con los diferentes explantes y medios de inducción de callo. La Figura 5 presenta el peso fresco de los callos por cada uno de los explantes y combinaciones de reguladores del crecimiento.

Cuadro 16 Análisis de varianza para el peso fresco de los callos, empleando 3 explantes y 6 medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg *et al.*

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T.		
					0.05	0.01	
BLOQUE	4	0.242655					
TRATAM	17	4.445042	0.261	4.799	1.79	2.27	**
A	2	1.116443	0.558	10.245	3.14	4.95	**
B	5	1.619000	0.324	5.943	2.36	3.32	**
AB	10	1.709599	0.171	3.138	1.98	2.60	**
ERROR	68	3.705175	0.054				
TOTAL	89	8.392871					

C.V. = 77.8910, A = explantes, B = medios de cultivo.

Cuadro 17 Prueba de Tukey para la interacción explantes x medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg *et al.*, con un nivel de significancia del 5 %.

Tratamiento 2,4-D/KIN (mg/l)	Explante	Promedio peso fresco gr	Presentación
0.1/0.5	Raíz	1.023	A
0.5/0.5	Raíz	0.561	B
0.1/1.0	Raíz	0.499	C
0.5/1.0	Embrión	0.425	D
0.1/0.5	Embrión	0.386	E
0.1/0.5	Hipocotilo	0.302	F
0.5/1.0	Raíz	0.298	F
0.5/0.5	Embrión	0.278	F G
1.0/1.0	Embrión	0.264	G
1.0/0.5	Embrión	0.234	H
1.0/1.0	Raíz	0.227	H
0.5/0.5	Hipocotilo	0.195	I
0.1/1.0	Hipocotilo	0.181	I
1.0/0.5	Hipocotilo	0.169	I
1.0/1.0	Hipocotilo	0.123	J
0.5/1.0	Hipocotilo	0.086	K
0.1/1.0	Embrión	0.075	K
1.0/0.5	Raíz	0.067	K

Tratamiento con igual letra son estadísticamente iguales.

2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético, KIN = N⁶furfuril aminopurina.

Medios de inducción de callo

	2,4-D	KIN (mg/l)
7)	0.1	0.5
8)	0.5	0.5
9)	1.0	0.5
10)	0.1	1.0
11)	0.5	1.0
12)	1.0	1.0

Tipos de explantes

- E = embrión
- R = raíz
- H = hipocotilo

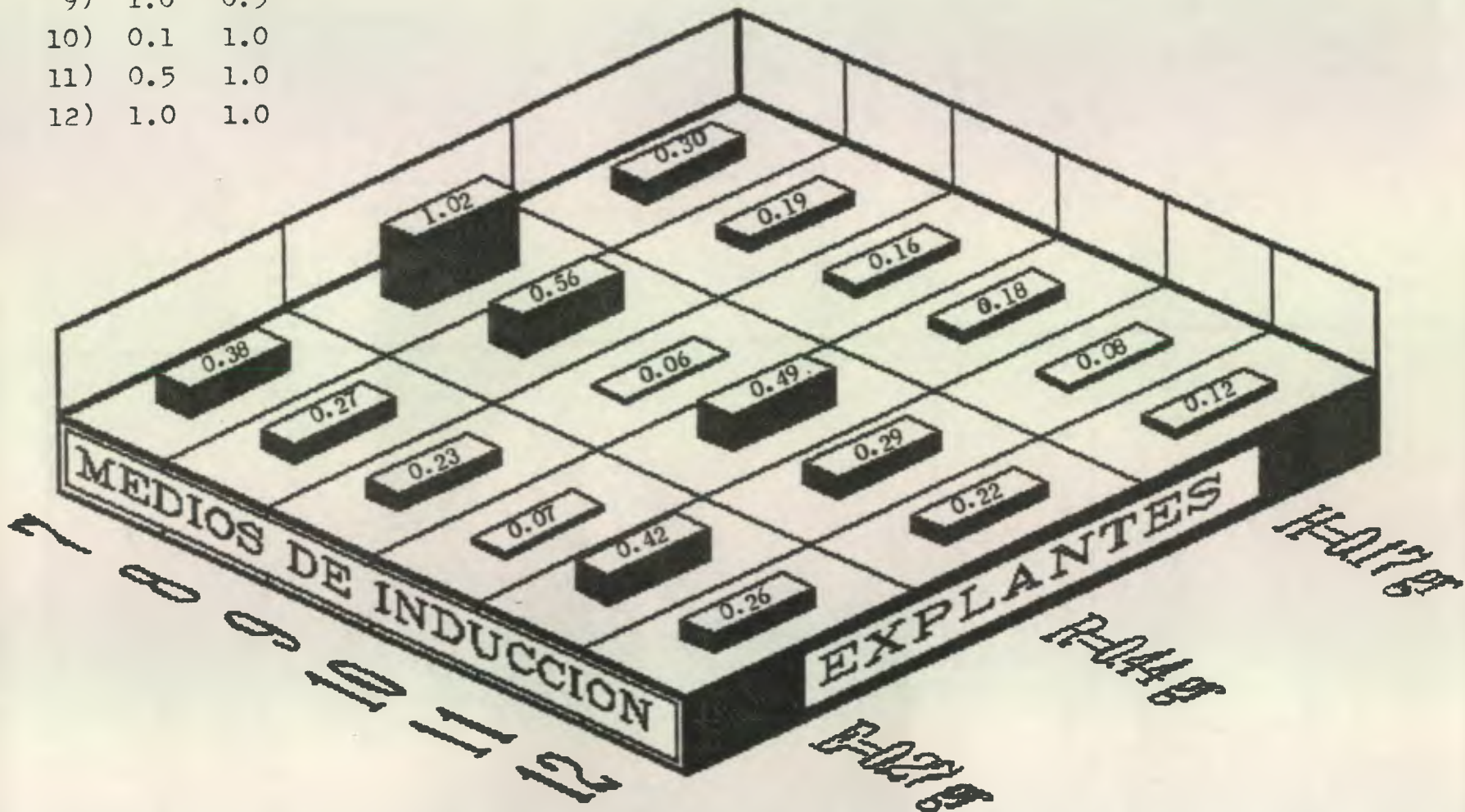


Figura 5 Peso fresco (gr) de los callos empleando tres explantes y seis medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al.

7.2.3 Consistencia de los callos

Todos los medios de inducción que contenía el medio basal Gamborg et al (B5) suplementado con 2,4-D y KIN, produjeron callos friables. Al aplicar la prueba de Q de Cochran no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos.

Se observó además que los callos presentaban una coloración amarillo café, de tamaño regularmente pequeño con un peso promedio de 0.29 g.

Los tejidos evaluados tuvieron un comportamiento similar en su apariencia frente a los medios de inducción, efectos parecidos se reportaron anteriormente en otras variedades (16, 23).

Al inicio los callos fueron friables, de color blanco como escarcha y cuando llegó a los 15 días, tenían la misma apariencia, pero cambiaron rápidamente a un color amarillo café.

La inducción de callos friables con la presencia del 2,4-D en el medio basal, fueron obtenidos anteriormente para otras variedades (20, 25) y coincide con nuestros resultados.

Las concentraciones más bajas y equilibradas de 2,4-D (0.1 y 0.5 mg/l) y KIN (0.5 mg/l) fueron las más eficientes en cuanto a la inducción de callo en explantes de raíz, en las mismas concentraciones se alcanzó el mayor peso fresco de callos provenientes de tejidos de raíz. Mientras que las concentraciones más altas de ambos reguladores del crecimiento fueron ineficaces a la inducción de callos en explantes de hipocotilo. El menor peso fresco se obtuvo en una mayor dosis de 1.0 mg/l de 2,4-D y en una menor concentración de 0.5 mg/l de KIN. Estadísticamente todos los callos fueron friables, de poco peso fresco y pequeños, lo cual concuerda con estudios hechos anteriormente (20, 25, 26).

7.3 Inducción de la regeneración de plantas

7.3.1 Callos originados en el primer grupo de medios de inducción de callo que contenía el medio basal Murashige y Skoog.

Los callos originados de explantes de embriones produjeron 6.7 % de callos con puntos verdes sobre el medio de regeneración que contenía 1.0 mg/l de la auxina ácido naftalenacético y 0.5 mg/l de la citoquinina bencil aminopurina (BAP), en el medio basal Murashige y Skoog. El 26.7 % de los callos se habían fenolizado, en tanto que el 22.2% presentó raíces secundarias, mientras que un 73.3% de los callos permanecían vivos a los 45 días de cultivo. Todos los medios de regeneración lograron incrementar el tamaño de los callos y mantuvieron su coloración inicial. En los callos donde aparecieron los puntos verdes se observaron más de un centro de regeneración por cada callo. En estudios anteriores se han reportado puntos verdes de regeneración y estructuras semejantes a embrioides en estado globoso o de torpedo (1, 3, 29, 30).

En los callos originados de raíces se fenolizaron el 15.6 %, en tanto que el 25.6 % produjeron raíces secundarias y el 84.4 % permanecieron igual en su apariencia inicial. Pero no hubo formación de puntos verdes en los callos.

En los callos derivados de explantes de hipocotilos el 53.3 % de los callos se habían fenolizado, mientras que el 28.8 % de callos produjeron raíces secundarias y el 46.6 % de callos permanecieron con su apariencia original.

Se deduce que los callos más perecederos fueron los originados de hipocotilos, mientras que los callos de raíces duraron más tiempo. La mayor cantidad de raíces se presentó en los callos derivados de hipocotilos. Los callos originados de explantes de embriones fueron los únicos en producir callos con puntos verdes.

Los puntos verdes y pequeñas porciones de callos inoculados sobre los

medios del segundo subcultivo mostraron los siguientes resultados: los callos incrementaron su tamaño y se pusieron de un color verde pálido, a excepción de los inoculados sobre el medio basal Murashige y Skoog sin reguladores del crecimiento, los cuales se fenolizaron antes que los otros medios que tenían reguladores del crecimiento, mientras que los puntos verdes sufrieron una ligera fenolización, debido a esto se transfirieron al medio del tercer subcultivo, pero los puntos verdes no mostraron ningún desarrollo adicional. La falta de desarrollo adicional de los centros de regeneración fue observado anteriormente en otros trabajos (18), sin embargo lograron permanecer verdes por más de 45 días. Esta característica fue observado por Crepy et al (9), por lo que este efecto esta de acuerdo con lo observado en la variedad Quinack Ché.

Entre los 45 a 77 días las porciones de callos incrementaron su tamaño, pero después de los 77 días presentaron senescencia debido a la falta de espacio y nutrientes (12). Esto indica que los callos se puede seguir manteniendo indefinidamente si se transfieren a otros medios de cultivo y sí se les proporcionan las condiciones adecuadas.

7.3.2 Callos originados en medios de inducción de callo que contenía el medio basal Gamborg et al.

Los resultados de la regeneración de plantas en los medios de inducción de callo que contenían el medio basal Gamborg et al, indican que en todos los tratamientos se observó un increment en el tamaño de los callos. Resultados parecidos se vió en callos producidos en un medio de inducción de callos que contenía 2,4-diclorofenoxiacético (10). Entre los 25 y 35 días la fenolización ocurrió en un 95 %, la producción de raíces secundarias sólo se observó en el 15 % de callos y sólo había el 5 % de callos con apariencia inicial. Sin embargo no se observaron callos con puntos verdes de regeneración. Este efecto posiblemente se

deba a la presencia del 2,4-D en el medio en la cual se originaron los callos (20, 25). Debido a que los callos presentaban el 95 % de senescencia antes de los 45 días, se optó por no presentar cuadros de resultados.

Los resultados sugieren que los callos producidos sobre el medio basal Gamborg et al, debe transferirse a otros medios de cultivo con más frecuencia para evitar su deterioro (23), ya que los mismos fueron muy perecederos posiblemente a causa de su textura friable.

8. CONCLUSIONES

- 8.1 En cuanto a la inducción de callo, el medio basal Murashige y Skoog suplementado con 5.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de KIN y utilizando el hipocotilo como explante es el tratamiento más eficiente para inducir callo. Mientras que en el medio basal Gamborg et al más 0.1 y 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN y empleando como explante la raíz, son los tratamientos más adecuados para la inducción de callo en la variedad de frijol Quinack Ché. Por lo que se acepta la primera hipótesis planteada.
- 8.2 En el medio basal MS suplementado con 5.0 mg/l de ANA y 3 mg/l de KIN se obtuvo mayor peso fresco en los callos, en tanto que empleando al embrión como explante se obtuvieron callos con mayor peso fresco. En el medio basal Gamborg et al más 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de KIN y utilizando la raíz como explante se obtuvieron callos con mayor peso fresco.
- 8.3 En relación a la consistencia de los callos, el medio basal Murashige y Skoog más los reguladores del crecimiento ANA y KIN presentaron callos de consistencia compacta, mientras que en el medio basal Gamborg et al con la adición de 2,4-d y KIN en los tres tipos de explantes mostraron callos friables.
- 8.4 Los callos producidos en el medio basal Murashige y Skoog suplementado con ANA y KIN son grandes de mayor peso fresco y de consistencia compacta. Mientras que los callos inducidos en el medio basal Gamborg et al más 2,4-D y KIN son pequeños, de menor

peso fresco y de consistencia friable.

8.5 En relación a la regeneración de plantas, los tratamientos usando el medio basal Murashige y Skoog más la adición de 1.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de bencil aminopurina presentaron centros de regeneración en callos derivados de explantes de embrión, pero no se logró la regeneración de plántulas a partir de callo. Debido a este resultado se rechaza la segunda hipótesis planteada.

9. RECOMENDACIONES

9.1 Realizar estudios semejantes a este trabajo, utilizando diferentes explantes y medios de inducción de callo en otras variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) con el fin de saber la respuesta de los tejidos frente a otras combinaciones de reguladores del crecimiento.

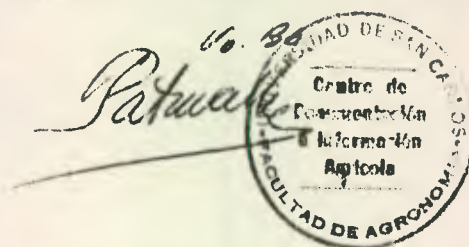
9.2 Ejecutar investigaciones de evaluación acerca de la capacidad de los callos en cuanto a la regeneración de plantas utilizando otros medios de regeneración, callos obtenidos de diferentes tejidos y otras metodologías, tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo.

10. BIBLIOGRAFIA

1. ALLAVENA, A. et al. 1987. Morphogenesis from immature cotyledons of P. coccineus and P. vulgaris cultured in vitro Milano, Italy, s.n. 12 p.
2. ———.; ROSSETTI, L. 1986. Micropropagations of bean Phaseolus vulgaris L.; effect of genetic, epigenetic and environmental factors. Scientia Horticulturae (Netherlands) 30:37-46.
3. ———. 1983. Efforts in somatic embryogenesis of Phaseolus vulgaris L. Acta Hortic (EE.UU.) 131:239-246.
4. ANGELINI, R.R.; ALLAVENA, A. 1989. Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (Phaseolus coccineus L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Japón) 19:167-174.
5. BIDWEL, R.G.S. 1979. Plant Physiology. 2ed. México, D.F., Macmillan Publishing. p. 75-477.
6. BIOINGENIERIA, PROMESAS y temores. 1985. Visión (Mex) 64(3):6-14.
7. BREUER, R. 1985. Somatic embryogenesis in Phaseolus vulgaris. Boon, Federal Republic of Germany, University of Bonn. 6 p.
8. CHATFIELD, J.M.; ARMSTRONG, D.J. 1985. Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of Phaseolus vulgaris L. cv. Great Northern. Hort Science (EE.UU.) 23(5):493-499.
9. CREPY, L.; BARROS, L.M.; VALENTE, V.R. 1986. Callus productions from leaf protoplast of various cultivars of bean (Phaseolus vulgaris L.). Plant Cell Report (Japón) 5:124-126.
10. CROCOMO, O.J.; PETERS, J.E.; SHARP, W.R. 1975. A literature review and the requeriments for grow of Phaseolus vulgaris L. in tissue culture. Arquivos de Biologia e Tecnologia (Bra.) 18:25-31.
11. ———. 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. Bd. (Germany) 78: 456-460.
12. HURTADO, M.; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
13. JACOBSEN, H-J.; ULBRICH, B.; HERBER, S. 1988. Regulation of soluble auxin-binding proteins in soybean cell suspensions. Plant Cell Report (Japón) 7:178-181.
14. KARTHA, K.K. et al. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. Can. J. Bot. (Can.) 59:1671-1679.
15. KERNS, H.R. et al. 1985. Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoud development in suspension culture soybean (Glycine max L. Merr.). Plant Cell Report (Japón) 140-143.

16. LIAU, D.F.; BOLL, W.G. 1970. Callus and cell suspension culture of bush bean (Phaseolus vulgaris). Can. J. Bot. (Can.) 48:1119-1130
17. MARTINS, I.S.; SONDAHL, M.R. 1984. Multiple shoot formation from shoot apex cultures of Phaseolus vulgaris L. J. Plant Physiol (EE.UU.) 115:205-208.
18. ————. 1984. Early stages of somatic embryo differentiation from callus cell of bean (Phaseolus vulgaris L.) grown in liquid medium. J. Plant Physiol. 117:97-103.
19. McCLEAN, P.; GRAFTON, K.F. 1988. Regeneration of dry bean (Phaseolus vulgaris L.) via organogenesis. Plant Science (EE.UU.) 60:117-122.
20. MOK, M.C.; MOK, D.W. 1977. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of Phaseolus. Physiol. Plant. (EE.UU.) 40:261-264.
21. ————; ARMSTRONG, D.J. 1978. Diferential cytokinin structures-activity relationship in Phaseolus. Plant Physiol. (EE.UU.) 61:72-75.
22. MUÑOZ F., L.C. 1989. Algunas metodologías experimentales utilizados en cultivo de tejidos de frijol. Colombia, CIAT. 18 p.
23. RAMOS O., G.A. 1983. Respuesta morfogénica en cultivo de tejidos de seis cultivares de frijol (Phaseolus vulgaris L.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 53 p.
24. RUBLO, A.; KARTHA, K.K. 1985. In vitro culture of shoot apical meristems of various Phaseolus species an cultivars. J. Plant Physiol. (EE.UU.) 119:425-433.
25. RUIZ, M.L. et al. 1986. In vitro culture of Phaseolus sp.:methodological aspects. Leon, Spain, Universidad de León, Facultad de Biología. 2 p.
26. RUIZ, M.L.; PELAEZ, M.I. 1986. A comparative study of callus formation and plant regeneration from different explants of Phaseolus vulgaris and Phaseolus coccineus. Berlin, Horn. p. 495-497.
27. SAKA, H. et al. 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. Plant Science Letters (EE.UU.) 19:193-201.
28. SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V. 1983. Handbook of plant cell culture; techniques for propagation and breeding. New York, Mcmillan Publishing. V. 2, p. 137-169.
29. SAUDERS, J.W.; HOSFIELD, G.L.; LELVI, A. 1986. Morphogenetic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on pinto bean (Phaseolus vulgaris L) leaf explants in vitro. Plant Cell Reports (Japón) 6:46-49.
30. SCHIEREN, B.; JACOBSEN, H-J. 1987. In vitro regeneration in Phaseolus vulgaris. Bonn, Federal Republic of Germany, University of Bonn. 4 p.

31. SMITH, J.G. 1972. Embryo development in Phaseolus vulgaris. Plant Physiol. (EE.UU.) 51:454-458.
32. SREEDHAR, D.; MEHTA, A.R. 1984. Diferenciación de brotes in vitro de explantes hipocotiledonarios y epicotiledonarios de Phaseolus lunatus. Indian J. of Experimental Biology. (EE.UU.) 22(6):345-346.
33. THORPE, T.A. 1987. Plant tissue culture and applications in agriculture. New York, Academic Press. 177 p.
34. VIJAYARAGHAVAN, S.J.; PENGELLY, W.L. 1985. Bound auxin metabolism in cultured crown-gall tissues of tobacco. Plant Physiol. (EE.UU.) 80:315-321.
35. WRIGHT, M.S. et al. 1986. Plant regeneration by organogenesis in Glycine max L. Merr. Plant Cell Report (Japón) 5:150-154.



Cuadro 18 "A" Composición química de los medios basales utilizados en la inducción de callos y regeneración de plantas de frijol (mg/l).

	MS	MS5	RB	B5
NH ₄ NO ₃	1650	1650	----	----
KNO ₃	1900	1900	2500	2500
KH ₂ PO ₄	170	170	170	---
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	---	---	---	150
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	440	---	150
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370	250	250
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	22.3	--	--
MnSO ₄ . H ₂ O	--	--	10.0	10.0
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	8.6	2.0	2.0
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	3.0
KI	0.83	0.83	0.75	0.75
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.25	0.50	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
CaSO ₄ . H ₂ O	--	--	150	--
(NH ₄) ₂ SO ₄	--	--	134	--
Myo-inositol	100	100	250	100
Acido nicotínico	0.5	1.0	1.0	1.0
Piridoxina-HCl	0.5	1.0	1.0	1.0
Tiamina-HCl	0.1	10.0	10.0	10.0
Glicina	2.0	--	2.0	--
Sucrosa	30000	20000	30000	20000

MS=Murashige-Skoog, B5=Gamborg et al, MS5=MS+B5, RB=medio designado RB.

Cuadro 19 "A" Número de callos inducidos sobre el medio basal Murashige y Skoog, a los 15 días de cultivo.

B \ T	EMBRIONES						RAICES						HIPOCOTILOS **					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
I	3	1	5	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
II	3	5	5	3	3	4	5	5	4	4	5	5	5	5	5	4	5	5
III	1	3	4	2	5	5	5	5	5	5	4	5	3	5	5	5	4	4
IV	3	5	5	4	5	5	5	4	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5
V	1	4	4	4	5	5	4	4	2	5	5	5	5	4	5	4	5	5

Cuadro 20 "A" Peso fresco de los callos inducidos sobre el medio basal Murashige y Skoog a los 15 días de cultivo.

B \ T	EMBRIONES						RAICES						HIPOCOTILOS **					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
I	1.469	0.2039	3.5081	0.9966	2.3545	0.9887	1.3922	1.4123	0.5364	0.4648	2.7477	4.7381	0.3414	1.0915	0.8325	2.201	1.4404	0.3367
II	0.6523	1.8964	3.5314	0.7118	2.1315	2.9262	0.2901	0.2855	0.2308	0.224	0.9576	0.783	1.4998	2.1561	1.0257	0.1584	2.0586	3.0265
III	0.1364	0.7375	0.7318	1.2252	2.7548	2.4877	0.2462	0.3282	0.3812	0.605	0.4892	0.9682	0.2309	0.5523	1.0612	2.093	0.6727	0.4614
IV	0.8532	3.9082	0.918	0.7116	2.4547	0.8123	0.4391	0.7615	0.9337	0.5513	0.2237	0.274	2.1376	1.5256	1.0308	1.5033	2.255	0.6389
V	0.0964	2.0708	2.7821	0.8898	2.477	1.5878	1.2231	0.6275	0.2145	1.0474	1.8878	5.3928	2.6328	2.8277	2.9509	0.989	1.4223	3.6381

Cuadro 21 "A" Consistencia de los callos inducidos sobre el medio basal Murashige y Skoog, a los 15 días de cultivo.

B \ T	EMBRIONES						RAICES						HIPOCOTILOS **					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

** Explantes. * Medios de inducción de callo.

Cuadro 22 "A" Número de callos inducidos sobre el medio basal Gamborg et al, a los 15 días de cultivo.

B \ T	EMBRIONES						RAICES						HIPOCOTILOS **					
	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12 *
I	5	4	5	5	3	4	5	5	5	3	4	5	3	5	5	4	0	2
II	5	5	4	4	5	5	5	5	4	5	2	4	5	5	5	4	2	0
III	5	5	3	3	2	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	3	4	0
IV	5	4	4	4	3	4	3	5	5	5	2	1	5	5	4	3	5	1
V	4	5	5	1	4	5	5	5	1	5	4	2	4	4	4	3	5	0

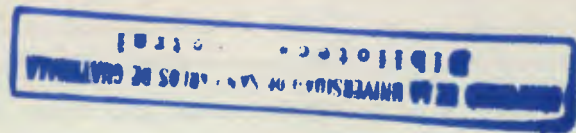
Cuadro 23 "A" Peso fresco de callos inducidos sobre el medio basal Gamborg et al, a los 15 días de cultivo.

B \ T	EMBRIONES						RAICES						HIPOCOTILOS **					
	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12 *
I	0.5858	0.1194	0.5152	0.0676	0.4253	0.1011	1.5312	0.4225	0.0768	1.0783	0.0186	0.453	0.0876	0.2568	0.2267	0.1613	0	0.4087
II	0.7919	0.4474	0.1926	0.0044	0.4253	0.4045	1.5489	0.4235	0.0153	0.3337	0.2146	0.2154	0.708	0.1798	0.1938	0.0197	0.0539	0
III	0.1145	0.39	0.2738	0.0403	0.2835	0.2022	1.1588	0.5684	0.014	0.1369	0.6352	0.103	0.471	0.3726	0.0444	0.0575	0.0098	0
IV	0.2945	0.1248	0.4906	0.1064	0.4235	0.1089	0.0882	0.6461	0.2128	0.3928	0.1497	0.0334	0.1126	0.0424	0.1712	0.1564	0.0284	0.2043
V	0.1448	0.3093	0.0954	0.1565	0.567	0.5056	0.7862	0.7437	0.0163	0.5557	0.4736	0.3325	0.1301	0.1239	0.2073	0.5114	0.3391	0

Cuadro 24 "A" Consistencia de los callos inducidos sobre el medio basal Gamborg et al, a los 15 días de cultivo.

B \ T	EMBRIONES						RAICES						HIPOCOTILOS **					
	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12	7	8	9	10	11	12 *
I	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
II	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
III	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
IV	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

** Explantes, * Medios de inducción de callo.



Cuadro 25 "A" Inducción de la regeneración de plantas en callos de embrión, originados sobre el medio basal Murashige y Skoog.

Tipo C	1E					2E					3E					4E					5E					6E				
Embred	Y	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z
I	F	F	v	F	v	F	v	Pv	vr	vr	F	v	v	v	Fr	v	v	v	v	F	Vr	v	v	vr	F	vr	vr	Pv	v	F
II	F	Fr	Pv	vr	v	Fr	v	v	v	F	vr	v	Pv	v	v	F	vr	Pv	v	F	v	vr	v	vr	v	vr	v	v	v	F
III	Fr	v	v	vr	v	Fr	v	v	v	F	v	v	v	vr	F	F	v	v	F	F	v	v	Pv	v	v	v	v	v	v	F

Cuadro 26 "A" Inducción de la regeneración de plantas en callos de raíz, originados sobre el medio basal Murashige y Skoog.

Tipo C	1R					2R					3R					4R					5R					6R				
Embred	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z
I	vr	v	v	vr	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	F	F	vr	Fr	v	F	v	vr	vr	v	F	v	v	v	v	F
II	v	vr	vr	vr	vr	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	Fr	vr	v	v	F	v	vr	v	v	F	vr	v	v	vr	vr
III	vr	F	v	vr	v	F	v	v	v	v	v	v	F	vr	F	v	vr	v	v	v	v	v	v	v	F	vr	v	v	vr	vr

Cuadro 27 "A" Inducción de la regeneración de plantas en callos de hipocotilo, originado sobre el medio basal Murashige y Skoog.

Tipo C	1H					2H					3H					4H					5H					6H				
Embred	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z	V	W	X	Y	Z
I	F	F	v	F	F	v	F	F	F	F	vr	vr	vr	v	v	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	vr	vr	vr	vr	F
II	Fr	F	v	vr	v	v	v	F	v	v	vr	vr	vr	F	v	F	F	F	Fr	F	F	F	F	F	F	F	Fr	F	vr	vr
III	vr	v	v	vr	v	r	v	v	vr	v	F	vr	v	v	F	F	F	F	v	F	F	F	F	F	F	vr	Fr	vr	vr	vr

F = fenolizado, r = presencia de raíz, v = callo vivo, Pv = puntas verdes, Tipo C = Tipo de callo. A los 45 días de cultivo.



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

LA TESIS TITULADA: "EVALUACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.), VARIEDAD QUINACK CHE"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: JUAN ALVARADO GOMEZ

CARNET NO: 54155

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ingenieros Agrónomos Fernando Rodríguez Bracamonte y Juan José Castillo.

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

PROHIBIDO EL PRESTAMO EXTERNO

Ing. Agr. Domingo Amador P.
ASESOR

Ing. Agr. Edgar Franco
ASESOR

Dr. Luis Mejía de León
DIRECTOR DEL IIA



IMPRIMASE:

Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
DECANO



/sler.

BIBLIOTECA CENTRAL-USAC
DEPOSITO LEGAL
PROHIBIDO EL PRESTAMO EXTERNO